

Durchflusszytometrie nach dem Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation von Dipl.-Phys. Stephan Quint aus Quierschied/Saar
Tag der Einreichung: 08.10.2014, Tag der Prüfung: 17.12.2014
Darmstadt 2015 — D 17

1. Gutachten: Prof. Thomas Walther
2. Gutachten: Dr. Michael Baßler



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Fachbereich Physik
Institut für Angewandte Physik
AG Laser und Quantenoptik

Durchflusszytometrie nach dem Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz

Genehmigte Dissertation von Dipl.-Phys. Stephan Quint aus Quierschied/Saar

1. Gutachten: Prof. Thomas Walther
2. Gutachten: Dr. Michael Baßler

Tag der Einreichung: 08.10.2014

Tag der Prüfung: 17.12.2014

Darmstadt 2015 — D 17

Bitte zitieren Sie dieses Dokument als:

URN: [urn:nbn:de:tuda-tuprints-46440](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:tuda-tuprints-46440)

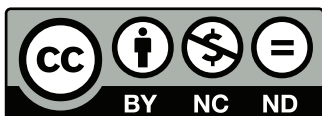
URL: <http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/4644>

Dieses Dokument wird bereitgestellt von tuprints,

E-Publishing-Service der TU Darmstadt

<http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de>

tuprints@ulb.tu-darmstadt.de



Die Veröffentlichung steht unter folgender Creative Commons Lizenz:

Namensnennung – Keine kommerzielle Nutzung – Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/de/>

Meinen Eltern.



Abstract

This work investigates a new technical approach in the field of flow cytometry. The fluorescent light of passing cells in a microfluidic channel is spatially modulated by a slit mask in between the channel and the detector yielding a non-periodic modulation signal for each traversing cell. Aside from a single detector in conjunction with a slit mask, it is demonstrated that pixel array detectors can also be used for implementing a spatial modulation scheme. Within the Poiseuille flow profile of the channel, cells migrate to specific equilibrium positions of their velocities which mainly depend on their size and morphology. This behavior is well known as the Segré-Silberberg effect and is a key technique of the measuring principle discussed within the framework of this thesis. For optical detection, cells are either specifically stained by fluorescent markers or tagged by fluorophore-conjugated antibodies attached to antigens at the cell surface. Due to their morphology, size and biological properties, fluorescent signals from different cell populations are primarily distinguished by their fluorescence intensity. Moreover, the velocity information of individual cells is encoded in the duration of the detected modulation signals. This parameter as well as the intensity information are recovered from raw data by appropriate digital signal processing methods. According to these parameters, different cell types can then be distinguished. Compared to conventional flow cytometry making use of fluorescent light and stray light for cell discrimination, the approach discussed here is fundamentally new and promises certain advantages. On the one hand, a larger detecting zone allows for higher mechanical robustness and less susceptibility to harsh environmental influences such as strong temperature fluctuations. On the other hand, our technique can be optimized for specific applications and relinquishes expensive optical elements. Certain methods for physical realization and implementation are evaluated and efficient digital signal processing methods are developed. A main subject of this thesis is the design of dedicated pulse compression filters enabling access to the detection parameters with maximal precision and maximal signal-to-noise-ratio (SNR) gain. For broad velocity distributions of cells, the ‘balanced’ filter has shown to be a suitable filter type which is discussed in detail in this work. Narrow velocity distributions are better processed by the so called ‘sidelobe optimized’ filter which shows much better signal dynamics and lower signal artifacts causing false detections. The underlying signal theory is mainly adapted from communications engineering and the field of RADAR technology and is discussed throughout this work. Focusing on binary modulation sequences, existing codes are evaluated for the principle of spatially modulated emission. Moreover, new criteria for performance rating are developed and new, better suited sequences are identified for our application. In the experimental part of the work, the functionality of the theoretically derived filters is demonstrated in a real application. Besides a benchmark of the SNR gain of different filter types, the detection of breast cancer cells (MCF-7) is demonstrated. Additionally, the principle is realized the first time with a pixel array detector allowing for an easier and much more flexible signal processing. Further application-specific designs aiming for miniaturization towards point-of-care diagnostics could highly benefit from this detection scheme. Examples are detector units for legionella in fresh water, CD-4 count (HIV surveillance) or detectors for circulating tumor cells in blood.



Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird ein neues technisches Verfahren der Durchflusszytometrie vorgestellt, bei dem das Fluoreszenzlicht von sich im Durchfluss befindlichen Zellen räumlich moduliert wird (Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz). Die Modulation folgt einer nichtperiodischen binären Sequenz und wird physikalisch entweder durch eine Schattenmaske zwischen der Flusszelle und dem Detektor oder einem pixelierten Detektor realisiert. Im Poiseuillschen Flussprofil nehmen die Zellen in Abhängigkeit ihrer Morphologie einen gewissen Gleichgewichtswert ihrer Geschwindigkeit ein. Dieses Verhalten wird als Segré-Silberberg Effekt bezeichnet und ist ein Schlüsselement des hier vorgestellten Messverfahrens. Zum optischen Nachweis der Zellen, werden diese entweder selektiv angefärbt oder mit spezifischen, fluoreszierenden Antikörper dekoriert. Aufgrund ihrer Gestalt, Größe und biologischen Beschaffenheit unterscheiden sich die Fluoreszenzsignale verschiedener Zellpopulationen vor allem in ihrer Fluoreszenzintensität. Die Geschwindigkeitsinformation der Zellen ist in der Länge der Modulationssignale encodiert und kann als Messparameter zusammen mit der Fluoreszenzintensität über geeignete Verfahren der digitalen Signalverarbeitung aus den Rohdaten gewonnen werden. Über die Intensitäts- wie auch Geschwindigkeitsinformation können verschiedene Zellpopulationen schließlich unterschieden werden. Dies stellt einen wesentlichen Unterschied zur konventionellen Durchflusszytometrie dar, bei der ausschließlich Fluoreszenz- und Streusignale genutzt werden. Die hier beschriebene Technik bietet einige Vorteile gegenüber dem konventionellen Ansatz. Durch die räumlich ausgedehnte Detektionszone ist die mechanische Realisierung einerseits unempfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperaturschwankungen oder Vibrationen. Andererseits kann - vor allem für spezielle Anwendungen - auf teure Optiken verzichtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden vor allem die verschiedenen physikalischen Realisierungsmöglichkeiten des Prinzips erarbeitet und neue, besonders leistungsfähige Methoden der digitalen Signalverarbeitung entwickelt. Das Hauptaugenmerk liegt auf der Entwicklung spezieller Pulskompressionsfilter, mit deren Hilfe die gesuchten Messparameter mit hoher Präzision und maximaler Rauschunterdrückung ermittelt werden können. Dabei wird vor allem auf Verwendbarkeit der digitalen Filter und nachgeschalteter Peak-Detektoren mit Echtzeit-Systemen wie FPGAs geachtet. Für breite Geschwindigkeitsverteilungen und geringe Zellkonzentrationen in der Probe hat sich vor allem das in dieser Arbeit diskutierte 'Balancierte' Filter erwiesen. Für enge Geschwindigkeitsverteilungen und hohe Zellkonzentrationen stellt das in dieser Arbeit entwickelte 'Nebenkeulenoptimierte' Filter die beste Filtermethode dar. Die signaltheoretische Betrachtung des Messprinzips wird im Rahmen dieser Arbeit vor allem aus der RADAR- und Nachrichtentechnik adaptiert und eingehend beschrieben. Ein weiterer Fokus dieser Arbeit liegt auf der Bewertung binärer Modulationssequenzen. Dazu werden sowohl vorhandene Modulationssequenzen aus der RADAR-Technik herangezogen, als auch nach geeigneteren neuen Sequenzen gesucht. Bewertungskriterien werden teilweise aus der Literatur übernommen sowie für den Anwendungsfall teils neu definiert. Im experimentellen Teil der Arbeit wird die Funktionsweise des Prinzips mit den in dieser Arbeit vorgestellten Pulskompressionsfiltern gezeigt. Neben einem Vergleich des Signal-zu-Rausch-Gewinns verschiedener Pulskompressionsfilter wird der Nachweis Brustkrebszellen (MCF-7) demonstriert. Darüber hinaus wird die Funktionsweise des Messprinzips mit einem pixelierten Detektor erstmals nachgewiesen, was eine wesentlich flexiblere und einfachere Signalverarbeitung zur Folge hat. Dies begünstigt beispielsweise den Bau eines miniaturisierten Durchflusszytometers, das auf spezielle Anwendungsfälle hin optimiert ist. Beispiele hierzu wären der Nachweis von Legionellen in Trinkwasser, CD4-Count (HIV Überwachung) oder Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen in Blut.



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Durchflusszytometrie	9
1.2	Aufbau konventioneller Durchflusszytometer	11
1.3	Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz	13
1.4	Zellcharakterisierung durch Geschwindigkeitsmessung	15
1.5	Anwendungsbeispiel: CD4 Count	17
1.6	Inhalt und Gliederung der Arbeit	18
2	Realisierungen	19
2.1	Grundkonzept	19
2.2	Modulation auf einem Kanal	20
2.3	Fluoreszenzausbeute	22
2.4	Modulation auf mehreren Kanälen	27
3	Grundlagen der Signalverarbeitung	32
3.1	Lineare zeitinvariante Systeme	32
3.2	Digitale Filterung	35
3.3	DC- und Rauschverstärkung digitaler Filter	38
3.4	Optimalfilterung	41
3.5	Zeit-Bandbreiten-Produkt	45
3.6	Design von Pulskompressionsfiltern	47
3.6.1	Flankenfilter	50
3.6.2	Balanciertes Filter	52
3.6.3	Nebenkeulenoptimiertes Filter	54
3.7	Vergleich der Pulskompressionsfilter	58
3.8	Manchester Transformation	59
3.9	Komplementäre Codes	61
3.10	Geschwindigkeitsanpassung der Filter	62
3.10.1	Geschwindigkeitsauflösung	63
3.10.2	Lineare Längenskalierung der Filter und Rundungsfehler	64
3.10.3	Interpolation der Filterkoeffizienten	68
4	Charakterisierung von LABS	72
4.1	Resonanzfall	72
4.2	Enge Geschwindigkeitsverteilungen	74
4.3	Breite Geschwindigkeitsverteilungen	78
5	Versuchsaufbauten	86
5.1	Einzel-Detektor-Setup	86
5.1.1	Chipdesign und Chipfertigung	86
5.1.2	Maskenfertigung	89
5.1.3	Optischer Gesamtaufbau	90
5.1.4	Strukturierte Anregung und Feldsimulation	93
5.2	Kamera-Setup	96

6	Experimente und Diskussion	99
6.1	Vergleich des SNR-Gewinns der Pulskompressionsfilter	99
6.2	Nachweis von MCF-7 Zellen	109
6.3	Implementierung von bipolaren Modulationssequenzen durch multiple Detektionspfade .	111
7	Zusammenfassung und Ausblick	114
A	LABS-Katalog	116
B	LabView Code zur Filteroptimierung	125
C	LabView Code zur Erzeugung von Komplementären Codes	126

1 Einleitung

1.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie beschäftigt sich mit der Charakterisierung und Unterscheidung von Zellen und Zellpopulationen bezüglich ihrer physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften im Durchfluss. Gegenüber der manuellen Auswertung unter dem Mikroskop, hat diese Technik den Vorteil, dass große Probepolumina innerhalb kurzer Zeit auf darin enthaltene Zellen überprüft werden können.

Basierend auf dem photoelektrischen Effekt wurden bereits Mitte der 1930er Jahre erste Überlegungen zur Durchflusszytometrie angestellt [2]. Tatsächliche Versuche wurden jedoch erst Ende der 1940er Jahre von den Gebrüdern Coulter durchgeführt. Gegenstand dieser Versuche war es, Zellen in ein Elektrolyt zu suspendieren und sie dann durch eine schmale Apertur driften zu lassen. Über die Impedanzänderung entlang der Apertur konnte dann auf die Anwesenheit und Größe (Volumen) der einzelnen, nicht-leitenden Zellen geschlossen werden. Das Messprinzip (Abb. 1.1) dieses so genannten Coulter-Counters wurde 1953 patentiert [1, 3] und findet heute noch Anwendung.

Neben solchen elektrischen Messverfahren werden in modernen Durchflusszytometern hauptsächlich die optischen Eigenschaften von Zellen abgefragt und vermessen. Dabei werden Zählraten zwischen 25000¹ und 70000² Ereignisse/Sekunde erreicht. Das Prinzip der optischen Durchflusszytometrie wurde in den 1960er Jahren von W. Dittich und W. Göhde erfunden und patentiert [4] und beruht auf der Lichtstreuung an Zellen sowie deren Fluoreszenzanregung. Da Zellen für gewöhnlich nicht leuchten, werden sie bei diesem Messprinzip zunächst mit einem Fluoreszenzmarkerstoff versehen, bevor sie bei Geschwindigkeiten von bis zu mehreren Metern pro Sekunde durch eine Messzelle geleitet werden. Innerhalb der Messzelle sind die Zellen dann hohen Lichtintensitäten einer oder mehrerer Lichtquellen ausgesetzt. Im Lichtfokus findet einerseits Lichtstreuung an den Zellen statt, andererseits wird der zugesetzte Markerstoff zur Fluoreszenz angeregt. Da die Amplitudenverhältnisse aus den verschiedenen Messparametern (Fluoreszenz- und Streulichtmessungen) für einen bestimmten Zelltyp spezifisch sind, können diese dann für die Zuordnung einzelner Zählereignisse zu bestimmten Zellspezies verwendet werden.

Beispielsweise kann aus den gleichzeitig auftretenden Messsignalen aus Vorwärts- und Seitwärtsstreuung ein sogenanntes Streudiagramm erzeugt werden, während das Fluoreszenzsignal als Trigger-Signal dient (oder umgekehrt), um gültige Signalpeaks zu identifizieren (Abb. 1.2). Durch Unterteilung des Streudiagramms in verschiedene geometrische Bereiche (Gating) werden dann anhand typischer Positionen die Zählraten für verschiedene Zellpopulationen ermittelt.

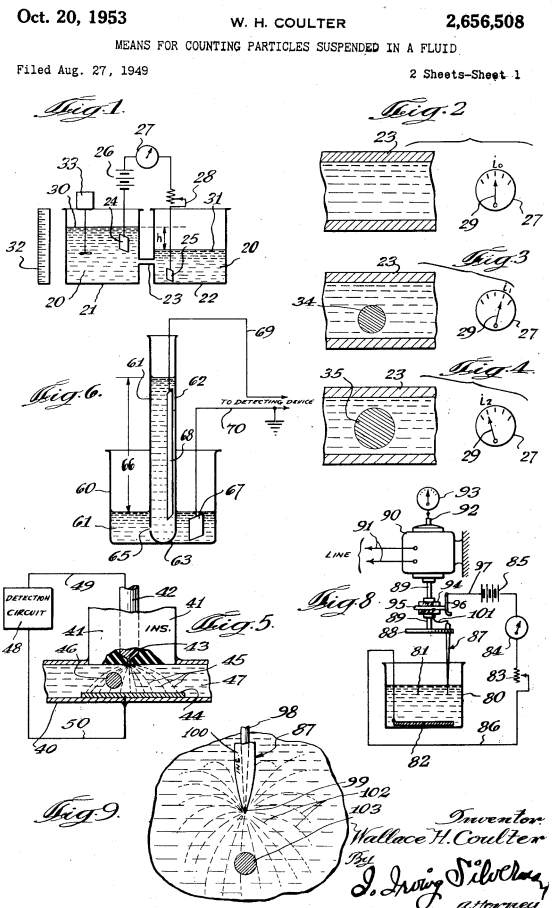


Abb. 1.1: Technische Zeichnungen zur Umsetzung des Coulter Counters. Entnommen aus dem Original-Patent von 1953 [1].

¹ Beckman-Coulter Gallios 10/3

² Sony SY3200

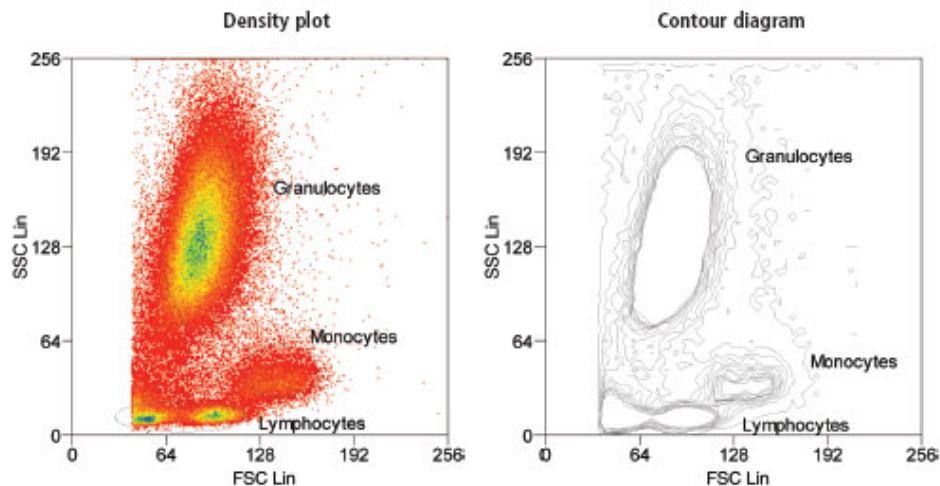


Abb. 1.2: Streudiagramme für eine Suspension aus Leukozyten (weiße Blutkörperchen). Anhand der Amplitudenverhältnisse aus Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreuung (SSC) lassen sich verschiedene Zellpopulationen (Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten) unterscheiden. Bild entnommen von [5].

Neben der Auftragung der Streusignale sind auch Streudiagramme aus verschiedenen Fluoreszenzsignalen oder Kombinationen aus Streu- und Fluoreszenzsignalen denkbar. Welche Parameter zur Zellidentifikation herangezogen werden, ist vom jeweiligen Anwendungsfall abhängig.

Zur Fluoreszenzmessung werden oft mehrere Fluoreszenzfarbstoffe verschiedener Emissionswellenlängen (Farbkanäle) eingesetzt, um weitere Unterscheidungsmerkmale innerhalb bestimmter Zelltypen zu erschließen. Die sogenannte Anfärbung der Zellen kann dabei über spezielle Antikörper erfolgen, die ihrerseits an einen Fluoreszenzmarker gekoppelt werden, oder über einen Markerstoff, der die RNA/DNA der Zellen färbt.

Bei der Lichtstreuung an Zellen unterscheidet man zwischen Vorwärts- (ca. 15-150°) und Seitwärtsstreuung (ca. 0, 5-15°). Während die vorwärts gerichtete Streuung hauptsächlich durch die Größe der Zellen beeinflusst wird, gibt die seitwärts gerichtete Streuung Auskunft über die Granularität, d.h. Zusammensetzung der Zellen (Abb. 1.3). Das in Vorwärtsrichtung gestreute Licht ist jedoch nur bedingt für eine Größenmessung zu gebrauchen, da Streusignale unter kleinem Streuwinkel stark schwanken können. Dies geht hauptsächlich auf die hohe Abhängigkeit des Streuwinkels vom Brechungsindex der Zellen zurück.

Durchflusszytometer werden oft in Verbindung mit Zellsortierern verwendet, die in Abhängigkeit der gemessenen Zell-Parametern eine Sortierung, d.h. eine gezielte Entnahme der Zellen aus dem Fluidstrom, vornehmen können. Somit ist es möglich, eine Zellsuspension in ihre Bestandteile zu zerlegen oder einen speziellen Zelltyp aus der Suspension zu isolieren, um weitere Untersuchungen durchzuführen.

Die aktuelle Forschung beschäftigt sich beispielsweise mit der Isolierung extrem seltener, zirkulierender Tumorzellen im Blut, die Aufschluss über einen Primärtumor geben können [7–10]. Dies ist auch dann möglich, wenn der Tumor noch nicht vom Patienten selbst oder anhand eines bildgebenden Verfahrens bemerkt wurde. Die Durchflusszytometrie könnte somit in der Zukunft einen großen Beitrag in der onkologischen Präventivdiagnostik leisten.

Aufgrund der hohen Anschaffungskosten, der Größe, der diffizilen Handhabbarkeit und der hohen Empfindlichkeit der am Markt verfügbaren Geräte ist die Durchflusszytometrie jedoch zum jetzigen Zeitpunkt auf Anwendungen im klinischen Laborumfeld beschränkt. Dies liegt hauptsächlich am hochkomplexen

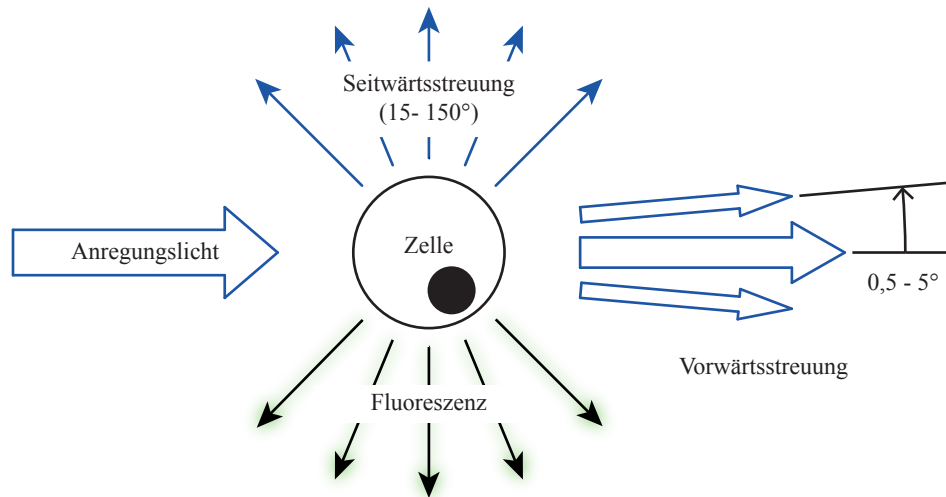


Abb. 1.3: Fluoreszenzanregung und Lichtstreuung an einer Zelle. Die Vorwärtsstreuung unter kleinem Raumwinkel findet an der Zelloberfläche statt und ist abhängig von der Größe und dem Brechungsindex der Zelle. Starke Variationen des Brechungsindex können starke Fluktuationen in der Winkelverteilung hervorrufen, sodass die Größenbestimmung nach dieser Methode zumeist stark fehlerbehaftet ist. Seitwärtsstreuung unter großem Raumwinkel geht auf die Granularität der Zelle zurück. Zusammen mit der Fluoreszenz, die isotrop abgestrahlt wird, geben alle genannten Parameter Auskunft über den Zelltyp (siehe [6]).

Aufbau konventioneller Geräte, die empfindliche Lichtquellen und eine hohe Anzahl optischer Komponenten und Detektoren enthalten.

1.2 Aufbau konventioneller Durchflusszytometer

Die wichtigsten Bestandteile eines konventionellen Durchflusszytomters sind eine fluidische Messzelle, eine Lichtquelle zur Anregung und Lichtstreuung sowie eine entsprechende Anzahl an Detektoren, die in Verbindung mit verschiedenen optischen Emissionsfiltern das Fluoreszenz- und Streulicht der Zellen erfassen (Abb. 1.4).

Als Lichtquelle kommen in konventionellen Geräten neben breitbandigen Gas-Entladungslampen (z.B. Quecksilber, Xenon) auch LEDs oder Laser zum Einsatz. Da viele Fluoreszenzfarbstoffe ein breitbandiges Anregungsspektrum besitzen, reicht oftmals monochromatisches Licht zur Lichtstreuung und Fluoreszenzanregung aus. Insbesondere für Spezialanwendungen eignen sich abstimmbare Laser als Lichtquelle besonders gut: Bei Linienbreiten von oft weniger als 1 nm ist das von Lasern erzeugte Licht inhärent gerichtet und liefert somit eine hohe Leistungsdichte.

Als Standard hat sich der Argon-Ionen Laser bei 488 nm etabliert, der bei gleicher Wellenlänge mittlerweile durch Dioden-Laser mit wesentlich geringerer Baugröße, weniger Betriebskosten und besserer Handhabung ersetzt werden kann. Mit Leistungen von aktuell bis zu 200 mW im Single-Mode Betrieb (488 nm), liefern Dioden-Laser sogar ein Vielfaches der Leistung, die mit Argon-Ionen Lasern nur unter großem technischem Aufwand und hohen Kosten realisiert werden kann. Weitere für die Zytometrie gebräuchliche Wellenlängen liegen im blauen, violetten und ultravioletten Bereich und genügen dem Anregungsspektrum vieler gebräuchlicher Farbstoffe.

Durchflusszytometer arbeiten immer nach dem Prinzip der Dunkelfeldmikroskopie [6]. Dies bedeutet, dass nicht etwa die Abschwächung des Anregungslichtes durch die Zellen vermessen wird (Durchlichtmikroskopie), sondern dass Sekundäreffekte wie Streuung oder Fluoreszenz detektiert werden. Der mechanische Aufbau des Zytometers muss daher so beschaffen sein, dass Licht, das direkt aus der Lichtquelle

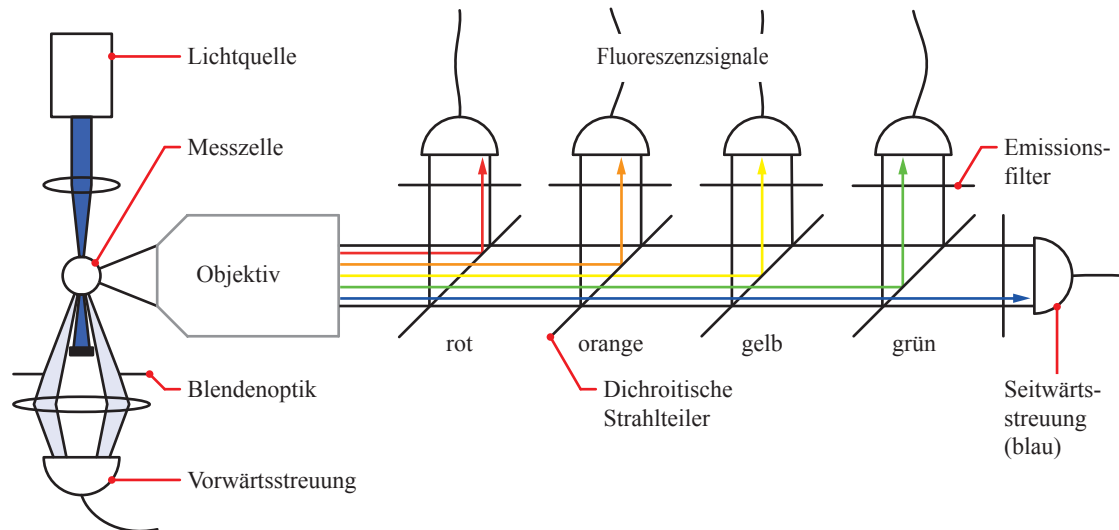


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. Wichtige Bestandteile sind eine Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung und Lichtstreuung, eine Messzelle und eine Vielzahl an Detektoren, die das Fluoreszenz- und Streulicht detektieren. Der Detektor zur Messung der Vorwärtsstreuung steht im Strahlengang des anregenden Lichtstrahls, wird jedoch durch eine geeignete optische Apertur abgeschattet, sodass eine Dunkelfeldmessung für kleine Raumwinkel erfolgen kann. Über ein Objektiv mit hoher Numerischer Apertur wird sowohl das Streu- als auch das Fluoreszenzlicht von Zellen unter großem Winkelabstand zur Anregungsachse gesammelt. Dieses Licht wird dann, je nach Bedarf, durch eine Vielzahl dichroitischer Strahlteiler aufgezwiegt und verschiedenen Detektoren (Farbkanäle) zugeführt. Der letzte Detektor der Kette misst das seitwärts gerichtete Streulicht.

stammt, weitestgehend ausgeblendet wird. Nur so lässt sich eine ausreichende Trennschärfe zwischen Anregungs- und Streulicht, wie auch zwischen Anregungs- und Fluoreszenzlicht herstellen.

Zur Messung des Streulichtes in Vorwärtsrichtung muss sichergestellt werden, dass das Anregungslicht in einem Winkelbereich zwischen 0° und $0,5^\circ$ bei leerer Messzelle durch eine Blende vollständig geblockt wird. Im Falle, dass sich eine Zelle im Detektionsbereich befindet, tritt hingegen Streulicht auf, das eine größere Winkelverteilung (ca. $0,5\text{--}15^\circ$) besitzt. Dieses Streulicht muss durch eine Sammellinse mit möglichst großer Numerischer Apertur aufgefangen und auf den Detektor (meist Photodiode) gelenkt werden. Im Gegensatz dazu befinden sich die Detektoren für das Fluoreszenzlicht und das seitwärts gestreute Licht im Dunkelfeld der Anregung. Bei diesen Detektoren handelt es sich auch bei neueren Geräten oft um Photomultiplier-Röhren, die besonders anfällig gegenüber mechanischer Belastung und Raumlicht sind und zum Betrieb hohe Spannungen benötigen.

Um ein hohes ‘Signal-zu-Rausch-Verhältnis’ (engl. *signal to noise ratio*, *SNR*) zu erzielen, müssen die Detektoren einen möglichst hohen Raumbereich erfassen. Dies wird in der Regel durch Mikroskopoptiken mit hoher Numerischer Apertur erreicht. In Verbindung mit entsprechenden Fluoreszenzfiltern gleicht der Gesamtaufbau dann einem Fluoreszenz- oder Epifluoreszenzmikroskop (Auflicht-Fluoreszenzmikroskop).

In der Durchflusszytometrie ist es besonders wichtig, möglichst fehlerfreie Zählraten für verschiedene Zellpopulationen zu erhalten. Dies wird üblicherweise durch einen Hüllstrom [11] erreicht, der zu einer hydrodynamischen Fokussierung des Probenstroms unterhalb des Zellreservoirs führt (Abb. 1.5) und die Zellen vereinzelt. Einzelne Zellen werden dann durch eine räumlich scharf begrenzte Detektionszone geleitet, in der das stark gebündelte Anregungslicht eine punktuelle Fluoreszenzanregung der Zellen hervorruft.

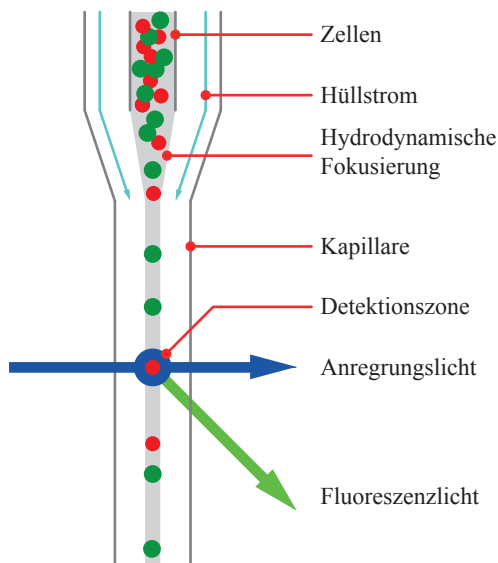


Abb. 1.5: Hydrodynamische Fokussierung mit Hilfe eines Hüllstroms führt zu einer Vereinzelung der Zellen. Über das Verhältnis der Flussraten von Hüll- und Probenstrom kann die Zelldichte in der Messzelle eingestellt werden.

Durch den scharfen Laserfokus (typischerweise $\leq 100\mu\text{m}$) und die hohe Numerische Apertur der Detektionsoptik sind konventionelle Durchflusszytometer besonders anfällig gegenüber unbeständigen Umwelteinflüssen (z.B. Temperatur) und Vibrationen. Obwohl moderne Geräte extrem leistungsfähig sind und hohe Erkennungsraten besitzen, ist der mobile Einsatz aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit ausgeschlossen.

1.3 Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz

Mit dem Ziel, ein robusteres, miniaturisierbares und günstigeres Durchflusszytometer zu bauen, wurde das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz erstmals 2008 von Kiesel et al. vorgeschlagen [12–14]. Im Gegensatz zu konventionellen Geräten kommt dieses Prinzip mit wesentlich schlichteren Optiken aus. Außerdem sorgt eine vergrößerte Detektionszone für ein besseres SNR bei gleichzeitig hoher räumlicher Trennschärfe zwischen den Zellen.

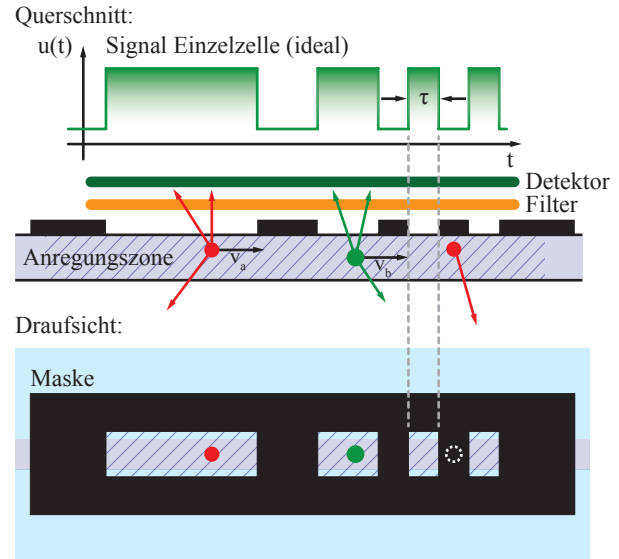
Das Schlüsselement dieser Technik stellt eine Schattenmaske dar, die sich zwischen Kanal und Detektor befindet und gemäß einer nichtperiodischen binären Sequenz S der Länge N strukturiert ist.

$$S = (s_0, s_1, \dots, s_{N-1}) \quad s_n \in \{0, 1\} \quad (1)$$

Die Koeffizienten 0 und 1 der binären Sequenz stehen dabei für opake Stege (0) und transparente Schlitze (1) der Maske. Werden Zellen im Bereich der Schattenmaske im Durchfluss zur Fluoreszenz angeregt, so strahlt das Fluoreszenzlicht gemäß der binären Sequenz durch die Schlitze der Maske, wird jedoch von den Stegen geblockt (Abb. 1.6). Der Detektor registriert dann, in Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Zellen, ein zeitlich moduliertes Fluoreszenzsignal, das der binären Modulationssequenz S entspricht und im Folgenden ‘Zellsignatur’ genannt wird.

Die binäre Modulationssequenz S hat die besondere Eigenschaft, dass eine Korrelation der Sequenz mit einer angepassten zweiten Sequenz zu einer sogenannten Pulskompression führt. Dies bedeutet, dass während der Korrelation eine kurzzeitige, zeitlich scharfe Signalüberhöhung des vormals zeitlich ausgedehnten Signals auftritt. Mit anderen Worten: die gesamte Signalenergie der Zellsignatur wird in einen zeitlich scharfen Signalpeak fokussiert. Für stark verrauschte Signale ist es somit möglich, die Signalamplitude des Korrelationssignals kurzzeitig über den Rauschhintergrund zu heben. Selbst für schwache Fluoreszenzsignale ($\text{SNR} \approx 1$) wird somit die Detektion per Schwellwert ermöglicht.

Abb. 1.6: Beim Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz werden die Fluoreszenzsignale von Zellen gemäß einer binären Sequenz im Durchfluss moduliert. Durch die vergrößerte Detektionszone und die damit verbundene lange Integrationszeit kann die Optik zur Anregung deutlich einfacher realisiert werden als bei konventionellen Durchflusszytometern. Die Signalbandbreite ist über den kürzesten Sub-Puls mit Länge τ des Signals festgelegt und bestimmt die maximale zeitliche und somit räumliche Auflösung, die durch die nachgelagerte digitale Signalverarbeitung erreicht werden kann.



Mathematisch ist die Korrelation mit der Faltung nah verwandt, die ihrerseits das Grundprinzip der Digitalen Filterung [15, 16] darstellt. Eine Sequenz H mit Koeffizienten h_n wird daher auch als Pulskompressionsfilter bezeichnet, wenn die Korrelation mit einem entsprechend modulierten Eingangssignal zu einer Pulskompression führt. Die Länge M des digitalen Filters kann dabei von der Länge N der Modulationssequenz S abweichen und die Filterkoeffizienten müssen nicht zwingend binär vorliegen:

$$H = (h_0, h_1, \dots, h_{M-1}) \quad h_n \in \mathbb{R} \quad (2)$$

Die Länge M des Filters, wie auch die Werte der Filterkoeffizienten h_n sind von entscheidender Bedeutung für die spätere Funktionsweise und Leistungsfähigkeit des Filters. Daher werden in Kap. 3 genauere Untersuchungen zum Filterdesign digitaler Pulskompressionsfilter angestellt. Zum grundlegenden Verständnis ist es zunächst noch nicht erforderlich, auf die tatsächliche Gestalt der Pulskompressionsfilter einzugehen.

Verglichen mit der konventionellen Durchflusszytometrie wird anhand bisheriger Erklärungen der Vorteil einer vergrößerten Detektionszone ersichtlich: Während bei konventionellen Durchflusszytometern das Anregungslicht punktgenau gebündelt werden muss, um ausreichend Fluoreszenzlicht in einem kurzen Zeitintervall zu erzeugen, findet beim Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz durch die Korrelation eine Integration der Fluoreszenzsignale über einen längeren Zeitraum statt. Durch die flächige Anregung in der gesamten Detektionszone können sowohl die Lichtquelle als auch die verwendeten Optiken deutlich einfacher realisiert werden. Der Verlust der zeitlichen Auflösung durch lange Integrationszeiten wird schließlich durch den Signalverarbeitungsschritt der Pulskompression kompensiert.

Die Breite τ des resultierenden Signalpeaks nach der Pulskompression legt die zeitliche Auflösung des Messprinzips fest und ist gegeben mit $\tau = \frac{L}{Nv}$. L steht dabei für die physikalische Länge der Maske, v kennzeichnet die Geschwindigkeit der jeweiligen Zelle. Folglich ist τ die Zeit, die von einer Zelle benötigt wird, um die kleinste Strukturgröße der Maske zu passieren. Die Gesamtlänge L der Maske, die auch die Größe der Detektionszone bestimmt, kann somit ein Vielfaches der Zellgrößen annehmen, ohne dass die räumliche Auflösung der Apparatur verringert wird (siehe Kap. 3.5).

Befinden sich mehrere Zellen in der Detektionszone (Abb. 1.7), kommt es zu einer Superposition aller Signalanteile, die durch den Schritt der Pulskompression auf einzelne, scharf getrennte Signalpeaks zurückgeführt werden können. Dies bedingt jedoch, dass der Mindestabstand der kleinsten Strukturgröße der Schattenmaske von zwei aufeinanderfolgenden Zellen nicht unterschritten wird.

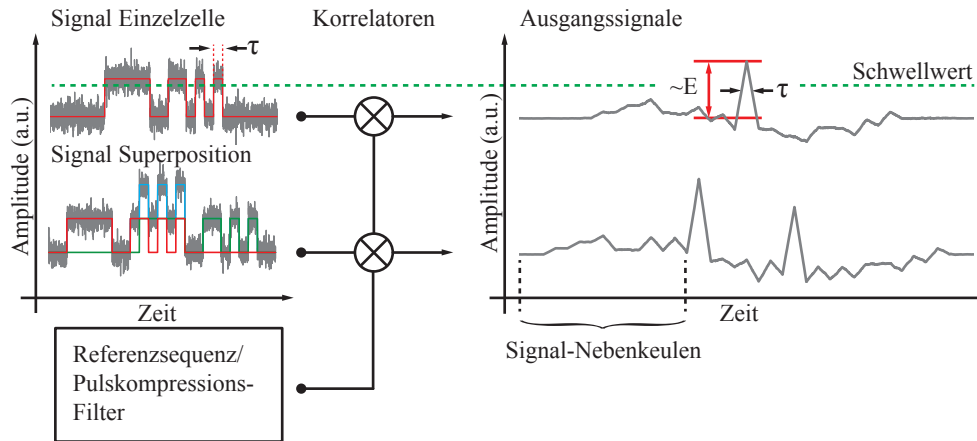


Abb. 1.7: Schematischer Ablauf der Signalverarbeitung, bei der ein verrauschtes Messsignal einer Puls-kompression unterzogen wird. Oben: Am Ausgang des Korrelators wird ein kurzzeitiger Signalhub erreicht, dessen Höhe proportional zur Signalenergie E (Kap. 3.3) ist und ein kurzzeitig erhöhtes SNR besitzt. Durch Vergleich des Eingangssignals mit dem Ausgangssignal ist zu erkennen, dass die Detektionsschwelle vor der Puls-kompression deutlich näher am Rauschen gewählt werden muss. Unten: Befinden sich mehrere Zellen in der Detektionszone, so kommt es zu einer Superposition der Fluoreszenzsignale. Trotz einer Überlagerung können durch Puls-kompression zwei distinkte Signalpeaks erzeugt werden. Signal-nebenkeulen treten dabei als Artefakte der Korrelation auf und sind spezifisch für die verwendete Sequenz/Filter-Kombination. Für dieses Beispiel wurde die Barker-13-Sequenz (Lfd. Nr. 19, siehe Anh. A) als Modulationssequenz verwendet. Bei dem Puls-kompressionsfilter handelt es sich um das sogenannte 'Balancierte Filter' (Kap. 3.6.2).

1.4 Zellcharakterisierung durch Geschwindigkeitsmessung

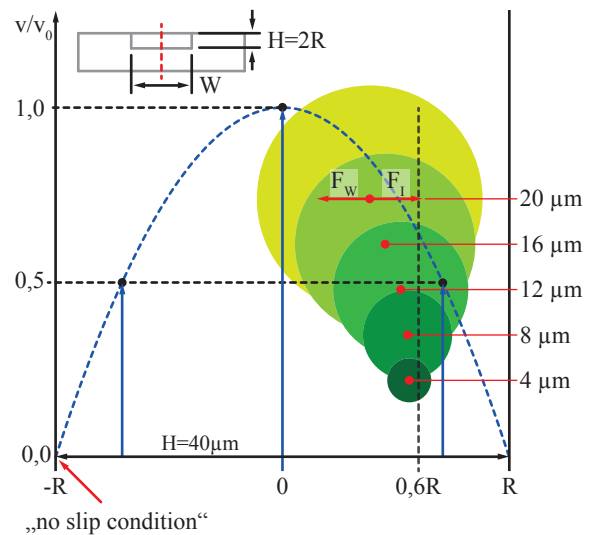
Nach Dittrich und Göhde werden mikrofluidische Kanäle oder Kapillarröhrchen genutzt, um Zellen zu vereinzeln und gezielt durch einen schmalen Lichtfokus zu leiten. Die Zellcharakterisierung erfolgt dann, wie bereits beschrieben, durch Bildung der Amplitudenverhältnisse aus Streu- und Fluoreszenzsignal. Das Streusignal ist jedoch stark abhängig vom individuellen Brechungsindex der Zellen und kann selbst für gleichartige Zellen stark schwanken. Unbeständige Umwelteinflüsse erfordern außerdem eine regelmäßige Rekalibrierungen der Apparatur. Vor allem in Hinblick auf einen mobilen Einsatz ist es daher wünschenswert, die Zellcharakterisierung auf andere Parameter als das Streulicht zurückzuführen.

Ein möglicher bislang ungenutzter Parameter stellt die Geschwindigkeitsinformation der Zellen im Poiseuillischen Flussprofil des Kanals dar, das sich bei laminarer Strömung von Newtonschen Fluiden (in-kompressible Flüssigkeiten mit linearem Fließverhalten) ausbildet. Für Rohre mit Radius R folgt das parabolische Flussprofil $v(r)$ der Gesetzmäßigkeit

$$v(r) = v_0 \left(1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right). \quad (3)$$

v_0 bezeichnet dabei die Maximalgeschwindigkeit im Scheitel des Flussprofils. Am Rand des Kanals verschwindet die Geschwindigkeitskomponente des Fluids durch starke Reibung vollständig ($v = 0$), was im Allgemeinen als 'no slip condition' bezeichnet wird. Für den Fall eines rechteckigen Kanals mit großem Aspektverhältnis, wie er auch für diese Arbeit verwendet wird, kann das Flussprofil in der Kanalmitte (bezogen auf die längere Seite) wie bei einem Rohr parabolisch angenommen werden, da dort Randeffekte keine Rolle spielen.

Abb. 1.8: Die Gleichgewichtspositionen inkompressibler sphärischer Partikel werden für verschiedene Partikelgrößen nach Hur et al. [19] gezeigt. Verglichen mit der Veröffentlichung sind die Angaben für die Höhe H und die Breite W in Anlehnung an das Chipdesign dieser Arbeit vertauscht. Neben den Gleichgewichtspositionen ist das ungestörte Geschwindigkeitsprofil in der Kanalmitte (längere Seite) eingezeichnet. Es ist anzunehmen, dass verschiedene Gleichgewichtspositionen der Partikel verschiedenen Geschwindigkeiten entsprechen. Dies wird dann besonders deutlich, wenn sich die Partikelgröße der Größe des Kanalquerschnitts nähert und die Inertialkraft F_I überwiegt. Die Gleichgewichtsposition für kleinste Partikel (im Verhältnis zum eindimensionalen Kanalquerschnitt) beträgt nach [17, 18] $0,6R$, wobei R dem Radius eines gleichgroßen Rohres entspricht.



Ausgehend vom Poiseuillschen Flussprofil wurde in der Arbeit von Segré und Silberberg [17] 1961 erstmals ein Effekt beschrieben, nach dem sich harte, inkompressible Kugeln in Abhängigkeit ihrer Größe im Fluss eines Rohres radial anordnen. Diese Gleichgewichtsposition geht auf ein laterales Kräftegleichgewicht zurück, das sich zwischen der sogenannten Inertialkraft (*engl. inertial force*) F_I , die in Richtung Kanalwand zeigt, und der Wandkraft (*engl. wall force*) F_W , die in Richtung Kanalmitte zeigt, einstellt. In einer genauer ausgeführten Folgearbeit [18] konnten beide Autoren darlegen, dass sich alle vermessenen Partikel unabhängig ihrer Größe beim 0,6-fachen des Rohrdurchmessers anordnen.

In neueren Publikationen nach Di Carlo und Hur et al. [19, 20] wurde der Aspekt der lateralen Anordnung von Partikel in mikrofluidischen Kanälen erneut aufgegriffen (Abb. 1.8). Insbesondere wird gezeigt, dass eine zunehmende Partikelgröße zu einer Verlagerung der Gleichgewichtsposition Richtung Kanalmitte führt, da die Wandkraft F_W die Inertialkraft F_I überwiegt. Außerdem konnten in Abhängigkeit des Elastizitätsmoduls der Partikel verschiedene Gleichgewichtspositionen im Strömungsprofil beobachtet werden. Eine wichtige Erkenntnis dieser Untersuchung ist, dass sich über die laterale Gleichgewichtsposition im Kanal auf den Typ der Partikel (Größe und Kompressionsverhalten) schließen lässt. In [19] wurde die Positionsbestimmung und somit die Partikelcharakterisierung per Hochgeschwindigkeitskamera vorgenommen.

Abbildung 1.8 lässt anhand des eingezeichneten Flussprofils weiterhin vermuten, dass es in verschiedenen Gleichgewichtspositionen zu unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten des Mediums und somit der Partikel kommt. Auch wenn der erste Eindruck eine simple Abhängigkeit zwischen Gleichgewichtsposition und Geschwindigkeit suggeriert, ist der tatsächliche Zusammenhang zwischen beiden Größen wesentlich komplexer. Aufgrund vieler Wechselwirkungsmechanismen mit dem Fluid und räumlicher Freiheitsgrade der Partikel, ist die Dynamik des Systems nur über Simulationen zu lösen. Während die theoretische Vorhersage einer Gleichgewichtsgeschwindigkeit für verschiedene Partikeltypen schwierig ist, konnte sie im Rahmen dieses Projektes [21–23] experimentell nachgewiesen werden.

Zur Messung von Geschwindigkeiten ist das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz bestens geeignet, da die Geschwindigkeitsinformation in der Signallänge τ der kleinsten Strukturgröße und somit auch in der Länge des Gesamtsignals einer jeden Zelle kodiert ist. Diese Geschwindigkeitsinformation kann durch Abfragen des Signals auf verschiedenen Geschwindigkeitskanälen gewonnen werden (Abb.

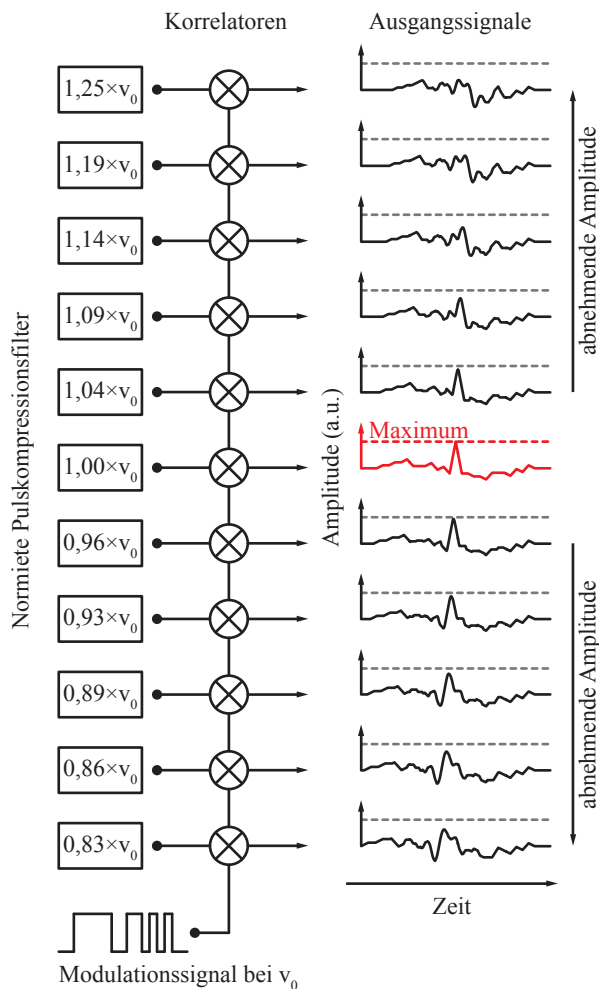


Abb. 1.9: Zur Ermittlung der Zellgeschwindigkeit wird die Zellsignatur auf verschiedenen Geschwindigkeitskanälen abgefragt. Dabei besteht jeder Kanal aus einem Filter, das auf eine bestimmte Geschwindigkeit resonant ist. Ausgehend von einer Zellsignatur mit Geschwindigkeit v_0 , ist für jeden abgefragten Kanal die prozentuale Geschwindigkeitsabweichung angegeben. Das maximale Ausgangssignal wird nur dann erreicht, wenn die die Zellgeschwindigkeit mit der Resonanzgeschwindigkeit eines Filters übereinstimmt (100%). Wie in Abb. 1.7 wurde für dieses Beispiel die Barker-13-Sequenz (Lfd. Nr. 19, siehe Anh. A) zusammen mit dem zugehörigen Balancierten Filter verwendet (siehe auch Kap. 3.6.2).

1.9). Jeder Kanal besteht aus einem digitalen Filter, das auf eine bestimmte Geschwindigkeit angepasst ist. Derjenige Kanal, der das höchste Korrelationssignal für ein bestimmtes Eingangssignal liefert, gibt die zugrunde liegende Geschwindigkeit eines Partikels wieder.

Anstelle eines Streudiagramms aus Streu- und Fluoreszenzsignal lässt sich, ausgehend vom Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz, ein Streudiagramm aus Intensitäts- und Geschwindigkeitsinformation erzeugen. Die jeweiligen Zellsignaturen lassen sich dann als Wertepaar aus Geschwindigkeit und Intensität der Zellen angeben. Diese Parameter zur Zellunterscheidung sind für spezielle Anwendungen ausreichend und können durch weitere Maßnahmen, wie spezifische Antikörper, verfeinert werden.

1.5 Anwendungsbeispiel: CD4 Count

Die Immunschwäche-Krankheit AIDS (engl. für *Acquired Immune Deficiency Syndrom*), die durch das HI-Virus (engl. für *Human Immunodeficiency Virus*) ausgelöst wird, zählt weltweit etwa 33 Millionen Erkrankte (Stand 2010) [24]. Im Endstadium der Krankheit sterben die Betroffenen aufgrund ihres stark geschwächten Immunsystems an opportunistischen Infektionen. Während Therapiemaßnahmen in Deutschland problemlos durchgeführt werden können, lebt die Mehrzahl aller HIV Infizierten im südlichen Afrika (22 Millionen). Aufgrund der fehlenden Infrastruktur und der mangelnden finanziellen Mittel sind Therapiemaßnahmen in solchen Regionen selten verfügbar und müssen zielgerichtet eingesetzt werden.

Das HI-Retrovirus befällt mithilfe seiner Oberflächenproteine hauptsächlich Zellen, die das Glykoprotein CD4 (engl. für *cluster of differentiation*) an ihrer Oberfläche tragen. Aus diesem Grund werden hauptsächlich T-Helferzellen des Blutes befallen, die eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr spielen.

Infizierte Zellen sterben entweder ab oder dienen als Reservoir für neue Viren, die innerhalb der Zellen vor der Immunabwehr des Körpers geschützt sind.

Infolge des viralen Befalles nimmt die Anzahl an T-Helferzellen im Laufe der Erkrankung stark ab. Während ein gesunder Mensch über mehr als 1000 Zellen pro μl Blut verfügt, liegen in einem kritischen Stadium von AIDS nur noch etwa 200 Zellen pro μl vor, sodass ab diesem Schwellwert spätestens mit einer Therapie begonnen werden muss.

Eine Verlaufskontrolle der Krankheit und somit ein gezielter Einsatz teurer Medikamente könnte beispielsweise über die Zählung von CD4 Zellen im Blut erfolgen. Eine solche Zählung stellt einen speziellen Anwendungsfall für ein Durchflussszytometer dar. Gerade das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz könnte in seiner einfachsten Form auf diesen speziellen Anwendungsfall hin optimiert werden. Ein entscheidender Vorteil dieser Technik ist, dass auf eine Vielzahl optischer Komponenten verzichtet werden kann und das Prinzip somit für den ambulanten Einsatz oder den Einsatz im Feld geeignet ist. Ein wegwerfbarer mikrofluidischer Kunststoff-Chip, der für das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz genutzt werden kann, stellt dabei ein weiteres wichtiges Argument für den mobilen Einsatz dar.

1.6 Inhalt und Gliederung der Arbeit

Insgesamt stellt das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz, welches im Rahmen des Projektes PoCyton am Fraunhofer ICT-IMM umgesetzt und weiterentwickelt wird, ein grundlegend neuartiges Verfahren zur Zelldetektion und Zellcharakterisierung dar. Sowohl die Fabrikation des Chips, verschiedene optische Aufbauten, als auch die Algorithmen und Methoden zur Signalverarbeitung wurden für das Projekt entwickelt und teilweise patentiert [25–27].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich neue Methoden zur Messdatenerfassung und Signalverarbeitung entwickelt. Zunächst wurde die Frage beantwortet, inwiefern binäre Modulationssequenzen in einem optischen System physikalisch implementiert werden können und welche Vor- und Nachteile die einzelnen Methoden besitzen (Kap. 2).

Kapitel 3 beschäftigt sich mit den Grundlagen der Signalverarbeitung, die für das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz essentiell sind. Dafür wird zunächst eine solide theoretische Basis für die diskrete Signalverarbeitung geschaffen, bevor die Technik der Digitalen Filterung eingeführt wird. Das Filterdesign für die digitalen Pulskompressionsfilter ist eines der zentralen Themen dieser Arbeit und wird anschließend eingehend beschrieben.

In Kap. 4 wird genauer auf die binären Modulationssequenzen eingegangen, die für die Anwendung sinnvoll erscheinen. Dabei wird zunächst erläutert nach welchen Kriterien die Sequenzen gesucht werden und wie sich die Ausgangssignale nach der digitalen Filterung verhalten. Beispielsweise kann es aufgrund von Signalnebenkeulen nach der Korrelation zu Fehldetektionen kommen. Solche Signalnebenkeulen können sowohl auf dem resonanten Geschwindigkeitskanal auftreten, als auch auf benachbarten Geschwindigkeitskanälen in der Nähe eines echten Signalpeaks. Für den Einsatz bei PoCyton gilt es deshalb, solche Sequenzen zu finden, die im gewünschten Arbeitsbereich der Apparatur einen besonders guten Signal-zu-Nebenkeulen-Abstand besitzen.

Insgesamt wurden im im Rahmen dieser Arbeit zwei Versuchsaufbauten realisiert, anhand derer die Funktionsweise des Prinzips der Räumlich Modulierten Fluoreszenz demonstriert werden soll. Diese Aufbauten unterscheiden sich vor allem in der Beschaffenheit des Detektors (Photodiode vs. Kamera) und werden in Kap. 5 genauer diskutiert. Insbesondere wird gezeigt, wie die Prinzipien aus Kap. 2 experimentell verwirklicht werden können.

Die Experimente, die an den einzelnen Aufbauten vorgenommen wurden, werden schließlich in Kap. 6 beschrieben und die dazugehörigen Ergebnisse ausführlich diskutiert.

2 Realisierungen

2.1 Grundkonzept

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden verschiedene Realisierungsmöglichkeiten aufgezeigt, nach denen eine Modulation der Fluoreszenzsignale von Zellen im Durchfluss vorgenommen werden kann. Eine Vielzahl der vorgeschlagenen Varianten wurden im Rahmen dieser Arbeit erdacht und bilden die Grundlage zum Verständnis der experimentellen Aufbauten (Kap. 5). Bei allen Umsetzungen wird der Fokus auf die Amplitudenmodulation des Fluoreszenzlichts gelegt. Neben dieser Modulationsart stehen durchaus weitere physikalische Freiheitsgrade als Modulationsträger zur Verfügung. So könnte beispielsweise die Wellenlänge oder Polarisierung des Lichts, die magnetischen Eigenschaften von Partikel oder spezielle Geometrien oder Strukturierungen des Chips ausgenutzt werden. Die Vielzahl an Möglichkeiten und deren Diskussion würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

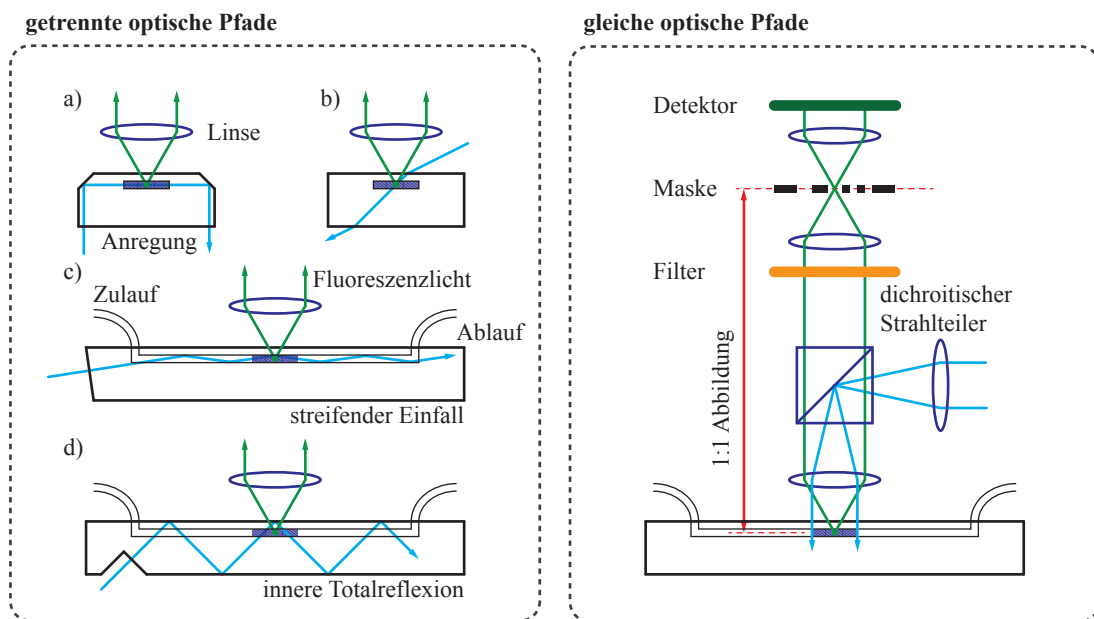


Abb. 2.1: Grundkonzepte zur Realisierung des experimentellen Aufbaus. Links: Getrennte optische Pfade zur Anregung und Detektion. Chipgeometrien können geschickt gewählt werden, um das Anregungslicht möglichst gut vom Detektionspfad zu isolieren. Rechts: Einseitiges Arrangement zur Anregung und Detektion. Der Vorteil dieser Ausführungsvariante besteht darin, dass der Chip leicht eingelegt und gewechselt werden kann, ohne dass eine erneute Justage des optischen Gesamtaufbaus erfolgen muss. Außerdem ist durch diese Anordnung eine kompakte Bauweise der optischen Detektionseinheit möglich.

Bereits zu Beginn der Planung eines experimentellen Aufbaus steht die Frage im Raum, wie die Lichtquelle zur Anregung platziert und die Detektion des Fluoreszenzlichts vorgenommen werden kann. Da das Anregungslicht in seiner Intensität (10 mW-1 W) viele Größenordnungen über der Intensität des Fluoreszenzlichtes liegt (nW Bereich), besteht das Hauptanliegen der experimentellen Umsetzung darin, eine möglichst gute räumliche Trennung zwischen Anregungs- und Fluoreszenzlicht zu erreichen. Die Verwendung hochwertiger optischer Filter (z.B. Interferenzfilter) zur Blockung des Anregungslichts ist dabei obligat. Die Abschwächung solcher Filter liegt unter optimalen Bedingungen (senkrechter Einfall) im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-7} und kann für Streulicht mit großer Winkelverteilung deutlich niedriger ausfallen. Es ist daher notwendig, die gesamte Detektionseinheit ins Dunkelfeld der Anregung zu verlagern, um einen Großteil des störenden Anregungs- und Streulichts bereits durch die Geometrie des Aufbaus zu unterdrücken. Ein geeigneter Filter kann dann zur weiteren Verbesserung des Kontrasts zwischen Fluoreszenz- und Anregungslicht beitragen.

Für die experimentellen Realisierung, muss zunächst entschieden werden, ob die Anregung der Zellen und Detektion des Fluoreszenzlichts einseitig ('Epifluoreszenzmikroskop') oder aus mehreren Raumrichtungen erfolgen soll (Abb. 2.1). Für die einseitige Verfahrensweise fallen die Lichtpfade für die Anregung und Detektion zu sammen. Der Vorteil dieses Arrangements besteht darin, dass das Einlegen oder Wechseln des fluidischen Chips in eine Halterung wesentlich einfacher durchgeführt kann. Weiterhin kann die Gesamtlänge aller optischen Pfade nach dieser Bauweise kurz gehalten und der Justageaufwand minimiert werden. Außerdem lässt sich ein solcher Aufbau gut in ein Gehäuse integrieren, sodass äußere Einflüsse (Raumlicht, Temperaturschwankungen, etc.) reduziert und eine ständige Rekalibrierung überflüssig werden. Nachteilig können sich hingegen Reflexionen und Streulicht auswirken, die durch das Anregungslicht an der Oberfläche des Chips und den Kanalwänden erzeugt werden. Die Wahl getrennter Pfade für Anregung und Detektion und eine geschickte Anpassung der Chipgeometrie könnte somit eine Alternative zu der sehr robusten Auflicht-Variante darstellen.

Nach Festlegung des Grundaufbaus muss entschieden werden, nach welcher Art die Signalmodulation vollzogen wird. Dabei stehen verschiedenen Möglichkeiten zur Verfügung, die von einer Strukturierung des Anregungslichtes bis zur Verwendung pixelierter Detektoren reichen. Je nach Art der Implementierung, stehen für das Modulationssignal verschiedene Freiheitsgrade zur Verfügung, die im folgenden Abschnitt genauer diskutiert werden.

2.2 Modulation auf einem Kanal

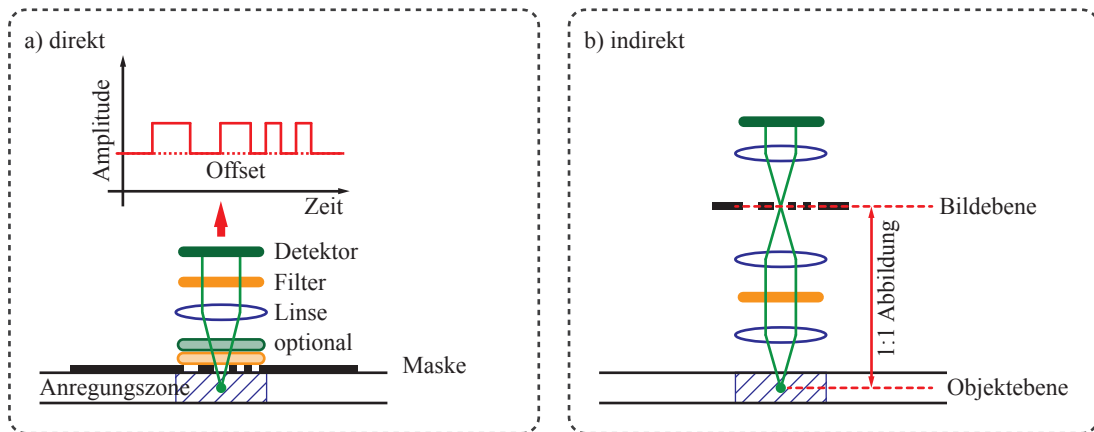
Die Verwendung eines einzelnen Detektors und damit eines einzelnen Detektionskanals stellt die ursprüngliche Variante dar, nach der das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz erstmals realisiert wurde. Die Idee besteht darin, das Fluoreszenzlicht passierender Zellen per Schattenmaske binär zu modulieren (Abb. 2.2 oben). Das Fluoreszenzlicht kann dabei nah der Objektebene moduliert werden (direkt), oder durch eine Optik auf eine entfernte Schattenmaske abgebildet und somit in der Ferne moduliert werden (indirekt).

Ein großer Vorteil der direkten Modulation besteht darin, dass der experimentelle Aufbau so klein wie möglich gehalten werden kann. Bis auf einen Emissionsfilter wird auf der Detektorseite keinerlei Optik benötigt, wodurch die Störanfälligkeit des Aufbaus stark verringert wird. Dieser einfachen Handhabung steht ein hoher Entwicklungsaufwand gegenüber. So können optimale Modulationsergebnisse und eine hohe Fluoreszenzausbeute nur dann erzielt werden, wenn sich die Maske so nah wie möglich an der Objektebene befindet und das Licht im Bereich ihrer Stege vollständig blockt. Die aufwändige Integration der Maske in den Chip bzw. in den Kanal kann nach derzeitigem Stand der Technik jedoch nur für geringe Stückzahlen unter hohen Fertigungskosten vorgenommen werden. Für die massenhafte Herstellung von fluidischen Chips müsste für diese Variante der Modulation zunächst ein günstiges Herstellungsverfahren gefunden und etabliert werden.

Zur Modulation des Fluoreszenzlichtes kommt neben der direkten Modulation auch die indirekte Modulation in Frage. Dabei wird das Fluoreszenzlicht durch verschiedene optische Komponenten, bestehend aus einer oder mehreren Linsen (Objektiv), zunächst aufgefangen, bevor es auf eine entfernte Maske abgebildet wird. Das Verfahren wurde bereits in [14] als 'remote sensing' beschrieben und hat den Vorteil, dass die Maske im optischen System verbaut ist und bei Bedarf getauscht werden kann. Ein entscheidender Nachteil dieser Technik ist, dass bereits kleine Ausrichtungsfehler des Systems dazu führen, dass die Modulation der Signale einbricht und der Modulationskontrast verschwindet. Dies kann bereits durch Temperaturschwankungen ausgelöst werden.

Neben der Modulation des Fluoreszenzlichtes stellt die räumliche Modulation des Anregungslichts (strukturierte Anregung) einen weiterführenden Schritt dar, der im Rahmen in dieser Arbeit experimentell realisiert wurde (Abb. 2.2). Wie bei der modulierten Fluoreszenz werden auch hier die Begriffe 'direkt' und 'indirekt' zur Unterscheidung verschiedener Anordnungen benutzt.

Modulation der Fluoreszenz



Modulation der Anregung

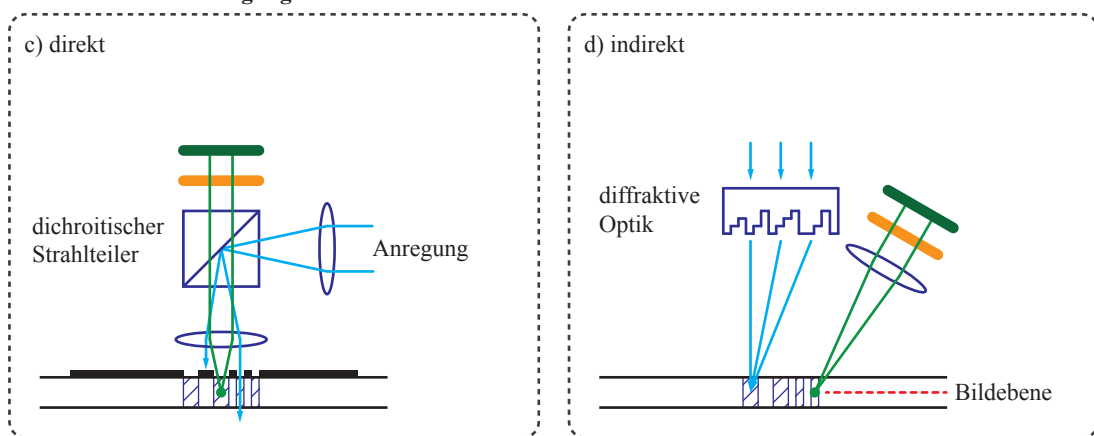


Abb. 2.2: Für das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz können sowohl das Anregungs- (oben) als auch als Fluoreszenzlicht (unten) räumlich strukturiert werden. In (a) ist die ursprüngliche Variante des Verfahrens gezeigt, bei der Anregung und Detektion über getrennte optische Pfade erfolgen. Die Schlitzmaseke wird so nah wie möglich ('direkt') an der Objekzebene platziert. Das modulierte Fluoreszenzlicht kann dann, je nach Position des Detektors, ohne weitere Optik detektiert werden. Bei der indirekten Modulation (b) wird eine Abbildung des Fluoreszenzlichtes auf die Schlitzmaseke vorgenommen. Anstelle der Modulation des Fluoreszenzlichtes kann auch eine räumliche strukturierte Anregung erfolgen. Bei der direkten Modulation des Anregungslichts (c) wird die Schlitzmaseke nahe der Objekzebene angeordnet, sodass das Anregungslicht partiell geblockt wird. Die indirekte Strukturierung (d) des Anregungslichts stellt die schwierigste Art einer Modulation dar. Dabei kann beispielsweise eine diffraktive Optik eingesetzt werden, um das Anregungslicht gemäß der gewünschten Sequenz in der Kanalmitte zu überlagern.

Bei der direkten Modulation erfolgt die Strukturierung der Anregung nahe der Objekzebene, indem das Licht durch eine Schattenmaske in verschiedenen Raumbereichen geblockt wird. Je näher sich die Maske am Kanal befindet, desto schärfer sind die Strukturen des Anregungslichts in der Objekzebene ausgeprägt. Befindet sich die Maske zu weit vom Kanal entfernt, kommt es zu Interferenzerscheinungen und der Modulationskontrast verschwindet mit zunehmendem Abstand. Erfolgt die Detektion des Fluoreszenzlichts zusätzlich durch die Maske hindurch (einseitige Anregung und Detektion), stellt diese Variante eine mechanisch sehr robuste Realisierungsmöglichkeit dar. Der Nachteil der direkten Modulation in Verbindung mit einseitiger Detektion ist der hohe Verlust an Fluoreszenzausbeute (siehe Kap. 2.3).

Die indirekte Modulation ist eine extrem aufwändige Alternative zur direkten Modulation der Anregung. Dabei wird die Modulationssequenz beispielsweise durch Beugung an einem diffraktiven optischen Element im Kanal durch konstruktive Interferenz erzeugt. Ein offensichtlicher Vorteil ist, dass im Idealfall das gesamte Anregungslicht zur Verfügung steht und nicht an einer Schattenmaske partiell geblockt wird. Nachteilig hingegen ist, dass ein einseitiger Aufbau nur schwer oder gar nicht realisiert werden kann. Die Herstellung eines diffraktiven optischen Elementes ist außerdem aufwändig und teuer und erfordert zudem die Festlegung auf eine gewisse Sequenz. Wie bei der indirekten Modulation des Fluoreszenzlichts ist der Aufbau extrem anfällig gegenüber Ausrichtungsfehlern und Erschütterung. Das Prinzip der indirekten modulierten Anregung scheidet somit aus Gründen der schwierigen Handhabung und der hohen Kosten als Realisierungsmöglichkeit für den Rahmen dieser Arbeit aus.

Allen eindimensionalen Modulationsvarianten ist gemeinsam, dass das vom Detektor stammende Fluoreszenzsignal gleich oder zumindest ähnlich ist. Durch die Modulation per Schattenmaske oder strukturierter Anregung gelangt entweder das volle Fluoreszenzlicht auf den Detektor oder es kommt zur vollständigen Blockung. Das Modulationssignal lässt sich daher, wie bereits in Kap. 1 vorweggenommen, durch eine Sequenz von Nullen (Blockung) und Einsen (Transmission) beschreiben. D.h. es liegt Information vor (1) oder nicht (0). Ein derartiges Signal wird im Jargon dieser Arbeit als unipolares Signal bezeichnet, da Ausschläge per Definition nur in positiver Richtung ($0 \rightarrow 1$ bzw. $1 \rightarrow 0$) erfolgen. Trotz dieser Definition ist das Detektorsignal als rein analoges Signal aufzufassen, dem eine Detektor-Offsetspannung und Rauschen überlagert ist und es somit durchaus negative Werte annehmen kann.

Unipolare Modulationssignale enthalten sowohl die Intensitäts- als auch die Geschwindigkeitsinformation von passierenden Zellen. Beide Charakteristika können für einen einzelnen Detektionskanal über eine angepasste Filterbank, wie sie in Abb. 1.9 dargestellt ist, zugänglich gemacht werden.

Anstelle eines einzelnen Detektors können für das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz auch mehrere Detektoren und somit mehrere Modulationskanäle verwendet werden. Für die Signalverarbeitung resultieren daraus wesentlich mehr und auch flexiblere Möglichkeiten zur Auswertung der Signale. Bevor dies in Kap. 2.4 genauer erläutert wird, wird zunächst eine Abschätzung über die Fluoreszenzausbeute und somit der Nachweiseffizienz verschiedener Detektionsvarianten gegeben.

2.3 Fluoreszenzausbeute

Die Ausbeute des Fluoreszenzlichts entscheidet maßgeblich über die Signalstärke und somit über die Sensitivität des Messaufbaus. Sie hängt von der Geometrie des Chips, der Beugung und Reflexion des Fluoreszenzlichts an verschiedenen optischen Grenzflächen und der Numerischen Apertur (NA) des verwendeten Objektivs ab. Nur ein Bruchteil (I_{\max}) der gesamten Fluoreszenzintensität I_{tot} kann daher vom Detektor erfasst werden. Befindet sich zusätzlich eine Schlitzmaske als optische Apertur zwischen Chipoberfläche und Detektionsoptik, so wird der detektierbare Raumwinkel weiter reduziert. In diesem Abschnitt wird zunächst eine analytische Abschätzung der maximalen Fluoreszenzausbeute verschiedener experimenteller Konfigurationen vorgenommen, bevor dann eine Ergänzung durch optische Simulationen (Raytracing) erfolgt.

Die Brechung des Lichts beim Übergang zwischen zwei optischen Medien mit abweichendem Brechungsindex wird durch das Snelliussche Gesetz

$$\frac{\sin(\Theta_1)}{\sin(\Theta_2)} = \frac{n_2}{n_1} \quad (4)$$

beschrieben. n_1 und n_2 sind dabei die Brechungsindizes der Medien, Θ_1 und Θ_2 die Winkel des einfallenden bzw. gebrochenen Lichtstrahls bezüglich der optischen Achse (Flächennormale des Übergangs).

Wird ein bereits gebrochener Strahl mit Winkel Θ_2 an einer weiteren Grenzfläche gebrochen, so gilt für den resultierenden Winkel Θ_3 :

$$\Theta_3 = \arcsin\left(\frac{n_1}{n_3} \sin(\Theta_2)\right). \quad (5)$$

Zur Berechnung der Fluoreszenzausbeute von Zellen in wässrigem Medium muss für den verwendeten mikrofluidischen Chip der optische Übergang Wasser \rightarrow PMMA \rightarrow Luft in Betracht gezogen werden (Abb. 2.3). Da die Fluoreszenzausbeute theoretisch durch den Winkel der Totalreflexion ($\Theta_3 = 90^\circ$) begrenzt ist, gilt für den maximal detektierbaren Raumwinkel Θ_1^{\max} :

$$\Theta_1^{\max} = \arcsin\left(\frac{n_3}{n_1} \underbrace{\sin(\Theta_3)}_{=1}\right) = \arcsin\left(\frac{1}{1,33}\right) = 48,75^\circ \quad (6)$$

Für Θ_2 ergibt sich ein Wert von $42,16^\circ$.

Über Θ_1^{\max} lässt sich dann die maximal mögliche Fluoreszenzausbeute I_{\max} als Verhältnis der von Θ_1^{\max} umrandeten Kugeloberfläche A_{\max} und der Oberfläche der Einheitskugel ($A_{\text{tot}} = 4\pi$) angeben:

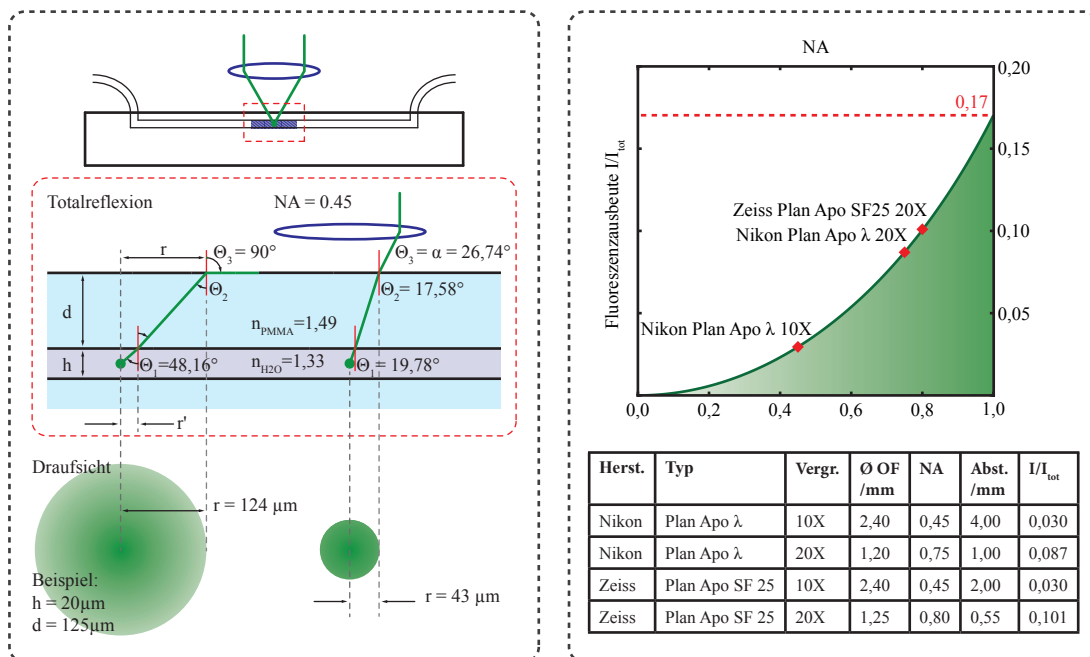


Abb. 2.3: Links: Die maximale Fluoreszenzausbeute wird durch den Winkel der Totalreflexion theoretisch begrenzt. Das NA der Abbildungsoptik (Linse, Objektiv) verringert die Fluoreszenzausbeute durch ihren begrenzten Akzeptanzwinkel zusätzlich. Rechts: Beispielhaft ist die maximale Fluoreszenzausbeute I_{\max} für verschiedene Mikroskoptypen dargestellt. Die maximale Größe des darstellbaren Objektfeldes (OF) hängt maßgeblich von der Vergrößerung der Objektive ab. Neben NA und OF kann auch der Arbeitsabstand für den späteren Einsatz von praktischer Bedeutung sein.

$$\frac{I_{\max}}{I_{\text{tot}}} = \frac{A_{\max}}{A_{\text{tot}}} = \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\Theta_1^{\max}} \sin \Theta d\Theta d\phi \quad (7)$$

$$= \frac{1}{2} (1 - \cos(\Theta_1^{\max})) \quad (8)$$

$$= 0,1704 \quad (9)$$

ϕ bezeichnet in vorangegangener Rechnung den Azimutwinkel der Integration in Kugelkoordinaten.

Bei einem PMMA Chip mit planarer Oberfläche können theoretisch nur etwa 17 % des gesamten Fluoreszenzlichts detektiert werden. Durch die eingeschränkte Numerische Apertur der Optik wird die Fluoreszenzausbeute noch weiter verringert.

Die Numerische Apertur NA einer Linse oder eines Objektivs ist definiert mit

$$NA = n \sin(\alpha), \quad (10)$$

wobei n der Brechungsindex des Mediums zwischen Objekt und Mikroskop ist. α ist dabei der halbe Akzeptanzwinkel des Objektivs. Für Trockenmikroskope (Mikroskopoptiken ohne Immersionsflüssigkeit) bezieht sich die Angabe der Numerischen Apertur immer auf Luft ($n = n_{\text{Luft}} = 1$). Für den halben Öffnungswinkel α erhält man somit

$$\alpha = \arcsin(NA). \quad (11)$$

Zur Berechnung der Fluoreszenzausbeute wird α gleich Θ_3 gesetzt. Für unterschiedliche NA -Werte von Objektiven ergeben sich dann gemäß Gl. 8 verschiedene Fluoreszenzausbeuten (Abb. 2.3, rechts). Der maximale Wert von 17 % kann dabei für Trockenobjektive nicht überschritten werden.

Wird zusätzlich eine Schlitzmaske zur direkten Modulation des Fluoreszenzlichtes zwischen Chipoberfläche und Objektiv eingesetzt, so wird der Lichtkegel des Fluoreszenzlichts durch die Apertur der Schlitzmaske beschnitten und die Ausbeute des Fluoreszenzlichts weiter reduziert (Abb. 2.4).

Der maximal detektierbare Raumwinkel entlang der Kanalmitte (Draufsicht) lässt sich dabei als Funktion der Strukturgröße l der Schlitzbreite eines einzelnen Schlitzes und der Maskendicke d_M angeben. Dazu wird zunächst die mathematische Abhängigkeit zwischen l und Θ_1 formuliert:

$$\frac{l}{2} = \frac{h}{2} \tan(\Theta_1) + d \tan(\Theta_2) + d_M \tan(\Theta_3) \quad (12)$$

$$= \frac{h}{2} \tan(\Theta_1) + d \tan\left(\arcsin\left(\frac{n_1}{n_2} \sin(\Theta_1)\right)\right) + d_M \tan\left(\arcsin\left(\frac{n_1}{n_3} \sin(\Theta_1)\right)\right) \quad (13)$$

$$\Rightarrow l = 2 * \left[\frac{h}{2} \tan(\Theta_1) + d \tan\left(\arcsin\left(\frac{n_1}{n_2} \sin(\Theta_1)\right)\right) + d_M \tan\left(\arcsin\left(\frac{n_1}{n_3} \sin(\Theta_1)\right)\right) \right] \quad (14)$$

Anstatt Gl. 14 nach Θ_1 aufzulösen, ist es einfacher, einen Plot der Umkehrfunktion darzustellen und den maximal detektierbaren Raumwinkel Θ_1^{\max} für eine bestimmte Strukturgröße l grafisch zu bestimmen (Abb. 2.4, unten).

Da der maximal detektierbare Raumwinkel nicht nur von l , sondern auch von d_M abhängt, muss der Wert für d_M als zusätzlicher Parameter gewählt werden. Für verschiedene Werte von d_M erhält man dann

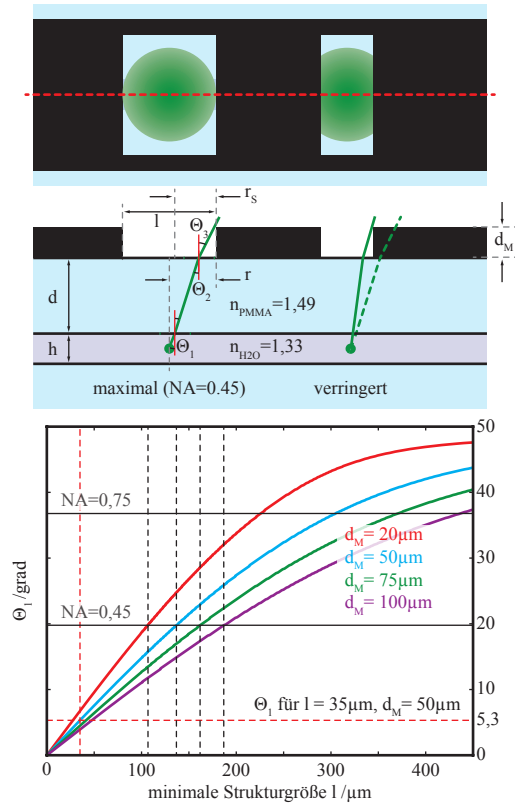


Abb. 2.4: Bei der direkten Modulation des Fluoreszenzlichtes (vgl. Abb. 2.2, (c)) wird der detektierte Raumwinkel durch die optische Apertur der Schlitzmase weiter eingeschränkt. Für verschiedene Dicken d_M der Maske ist der maximal detektierte Raumwinkel entlang der Kanalmitte (rot gestrichelt) als Funktion der Strukturgröße l der Schlitzmase dargestellt. Eine Abschätzung der maximalen Fluoreszenzausbeute für verschiedene d_M und l kann am besten per Ray-Tracing-Simulation durchgeführt werden.

eine Funktionenschar, auf der die zugehörigen Wertepaare von l und Θ_1^{\max} liegen. Der maximal detektierte Raumwinkel entlang der Kanalmitte (Draufsicht) beträgt bei einer Maskendicke d_M von $50\,\mu\text{m}$ und einer minimalen Strukturgröße l von $35\,\mu\text{m}$ beispielsweise $5,3^\circ$. Bei Verwendung eines Objektivs mit $NA = 0,45$ müsste die minimale Strukturgröße deutlich über $100\,\mu\text{m}$ liegen, um die maximale Signalamplitude zumindest kurzfristig zu erreichen. Die Zelle muss sich dabei genau in der Mitte des Schlitzes befinden. Die Parameter des vorangegangenen Beispiels sind in Anlehnung an den experimentellen Aufbau (Kap. 5.1) gewählt.

Die vorangegangene Rechnung soll verdeutlichen, dass die Fluoreszenzausbeute durch die direkte Modulation erheblich verringert wird. Ein genauer Wert für die maximal erreichbare Fluoreszenzausbeute und der Signalverlauf einer Zelle im Durchfluss lässt sich analytisch nur schwer berechnen. Umfassende Simulationen sind für die Beantwortung dieser Fragestellungen unabdingbar und am besten per Ray-Tracing, z.B. mit der Software Zemax, durchzuführen. Im Folgenden wird der Ablauf einer optischen Simulation anhand einer beispielhaften Konfiguration beschrieben.

Für die Simulation muss zunächst eine entsprechende physikalische Konfiguration des experimentellen Aufbaus (Abb. 2.5 links) geschaffen werden, bevor verschiedene Konfigurationsparameter wie etwa Strukturgröße l , Dicke der Maske d_M oder Position der Zelle im Kanal variiert werden können.

Bei einem ersten Simulationsdurchgang wird zunächst die maximale Fluoreszenzausbeute ermittelt, die sich für verschiedene Strukturgrößen (optische Apertur) der Maske ergeben. Dazu werden verschiedene Dicken d_M der Maske angenommen und die Strukturgröße l in $1\,\mu\text{m}$ -Schritten von 5 – $200\,\mu\text{m}$ variiert. Alle anderen Parameter, wie die Dicke der Deckelfolie ($d = 125\,\mu\text{m}$), die Kanalhöhe ($h = 20\,\mu\text{m}$), die Breite des Kanals ($500\,\mu\text{m}$), die Breite der Schlitzes in y-Richtung ($1\,\text{mm}$) und die Numerische Apertur der Detektionsoptik ($NA = 0,45$), werden für die Simulationen konstant gehalten. Die Detektionsoptik besteht der Einfachheit halber nur aus einem Detektor, der der Geometrie eines Objektivs (Nikon Plan Apo λ 10X) nachempfunden ist. Somit wird angenommen, dass alle Strahlen, die in das Objektiv gelangen, auch den Detektor erreichen.

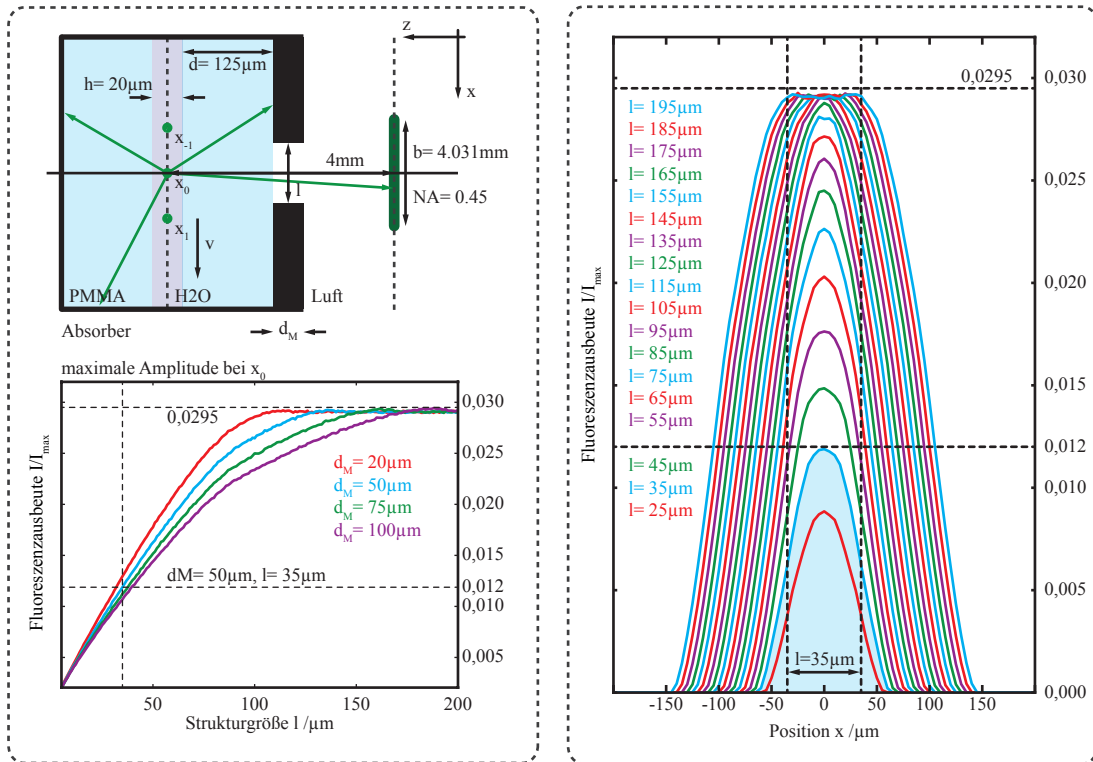
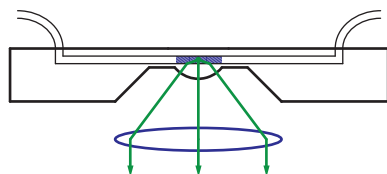


Abb. 2.5: Simulationskonfiguration (oben links), maximale Fluoreszenzausbeute (unten links) und Signalverlauf bei Verwendung einer optischen Apertur (rechts). Die Fluoreszenzausbeute wird per optischer Simulation (Raytracing) ermittelt und hängt maßgeblich von den Parametern der Schlitmmaske, wie auch der Position einer Zelle im Kanal ab. Für verschiedene Positionen einer Zelle im Kanal (x -Richtung) erhält man den zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzsignals im Durchfluss (Zellsignatur). Die Zellsignatur weist dabei starke Abrundungen ihrer Flanken auf.

Anhand des Diagramms (Abb. 2.5 links) lässt sich erkennen, dass für ausreichend großes l die Fluoreszenzausbeute für alle d_M gegen einen Wert von etwa 3 % konvergiert. Dies stimmt sehr gut mit der theoretischen Vorhersage für die maximale Fluoreszenzausbeute I_{max} in Abb. 2.3 überein und ist der Tatsache geschuldet, dass die Fluoreszenzausbeute ab einer gewissen Strukturgröße nur noch durch die Totalreflexion an der Chipoberfläche beschränkt wird. Für eine Maskendicke von $50\mu\text{m}$ und einer minimalen Strukturgröße von $35\mu\text{m}$ ergibt sich für die maximale Fluoreszenzausbeute I_{max} nur noch ein Wert von ca. 1,2 %.

In einer zweiten Simulation (Abb. 2.5 rechts) wird überprüft, wie stark die maximale Fluoreszenzausbeute durch eine veränderte x -Position der Zellen verringert wird. Dazu wird die Position der Zelle in $5\mu\text{m}$ Schritten im Bereich $x = -200\mu\text{m}$ bis $x = 200\mu\text{m}$ ausgehend von der optischen Achse variiert. Es soll verdeutlicht werden, wie die Signalamplitude durch die Apertur der Maske moduliert wird und dass für eine reale Messung kein rechteckiger Signalverlauf zu erwarten ist. Die Breite der Signalflanken ist für kleine Strukturgrößen (im Bereich von $100\mu\text{m}$) in etwa von der Größenordnung der Öffnung und wird durch die physikalische Ausdehnung der Zellen (ca. $10\mu\text{m}$) nur geringfügig vergrößert. Zusätzlich zur x -Position wird auch die Strukturgröße l bei fester Maskendicke ($d_M = 50\mu\text{m}$) variiert. Überschreitet die Strukturgröße einen gewissen Wert ($l \geq 150\mu\text{m}$), so erfährt das Fluoreszenzsignal eine abgeflachte Amplitude, deren Höchstwert der maximalen Fluoreszenzausbeute von etwa 3 % entspricht. Für die Beispielfigur mit $l = 35\mu\text{m}$ wird das Intensitätsmaximum von 1,2 % auch bei dieser Simulation gefunden.

(a) geformte Oberfläche



(b) integrierte GRIN-Linse

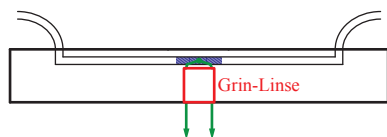


Abb. 2.6: Die Fluoreszenzausbeute kann verbessert werden, indem der Chip entweder mit optimierten Oberflächen versehen wird (a) oder indem Optiken wie GRIN-Linsen integriert werden (b). Bei einer Integration von Optiken muss darauf geachtet werden, dass keine zusätzlichen optischen Grenzflächen entstehen (z.B. Lufteinschluss), an denen Lichtbrechung stattfindet.

Da beide Simulation viele verschiedene Simulationsparameter abdecken, wurde der Simulationsablauf in Zemax mit Hilfe einer MATLAB-Schnittstelle automatisiert. An dieser Stelle gilt Herrn Dr. Christof Thahammer (Berlin Ultrahigh Field Facility (B.U.F.F.), Max-Delbrueck-Center for Molecular Medicine, Berlin) mein besonderer Dank, der alle Simulationen freundlicherweise übernommen und die Veröffentlichung der Ergebnisse an dieser Stelle ermöglicht hat.

Sowohl die theoretischen Abschätzungen als auch die Simulationsergebnisse zeigen, dass durch die Chipgeometrie sowie durch das Modulationsverfahren ein erheblicher Teil der Fluoreszenzlichtes verloren geht. Eine Möglichkeit den maximal detektierbaren Raumwinkel zu vergrößern, bestünde beispielsweise darin, die Detektion des Fluoreszenzlichts nicht durch die Maske hindurch vorzunehmen, sondern von der entgegengesetzten Seite. Die Modulationssequenz würde in diesem Fall über die Modulation des Anregungslichts realisiert. Um die Fluoreszenzausbeute weiter zu erhöhen, könnte der Chip mit einer gekrümmten Oberfläche (Linse auf der Chipoberfläche) versehen- oder eine Grin-Linse direkt in den Chip integriert werden (Abb. 2.6). Beide Methoden ziehen jedoch einen hohen Fabrikationsaufwand nach sich: Sowohl für Spritzguss- als auch für ein Heißpräge-Verfahren werden Optimierungen in der Regel iterativ vorgenommen (Wärmeausdehnung und Schrumpfen des Kunststoffes), was bedeutet, dass die notwendigen Werkzeuge unter hohen Kosten ständig neu angepasst werden müssten. Auch das Einkleben von Grin-Linsen mit Stückpreisen im ein- bis zweistelligen Euro-Bereich ist für eine Massenproduktion (Chip als Wegwerfprodukt) keine wirkliche Alternative. Daher muss für den späteren Anwendungsfall ein Kompromiss zwischen Kosten, Sensitivität, Robustheit und Anwenderfreundlichkeit gefunden werden.

2.4 Modulation auf mehreren Kanälen

Die Erweiterung des Modulationsprinzips auf mehrere Detektionskanäle beruht auf der Aufspaltung des Fluoreszenzlichtes (z.B. über einen oder mehrere Strahlteiler) in verschiedene optische Pfade. Für jeden Pfad wird das Fluoreszenzlicht auf verschiedene Schlitzmasken abgebildet und dann jeweils von einem Detektor erfasst. Daraus resultieren unterschiedliche Modulationssignale, die jeweils mit unkorreliertem Rauschen überlagert sind. Neben diskreten Detektoren können für die Modulation auf mehreren Kanälen auch pixelierte Detektoren (z.B. TDI-CCDs, EMCCDs, pixelierte APD-Arrays) verwendet werden. Je nach Detektionsmethode und implementierter Modulationssequenz ergeben sich dann neue und weitaus flexiblere Möglichkeiten für die nachgelagerte Signalverarbeitung. Zudem kann das SNR eines Einzeldetektors durch geschickte Überlagerung oder Kreuzkorrelation zwischen mehreren Detektionskanälen verbessert werden.

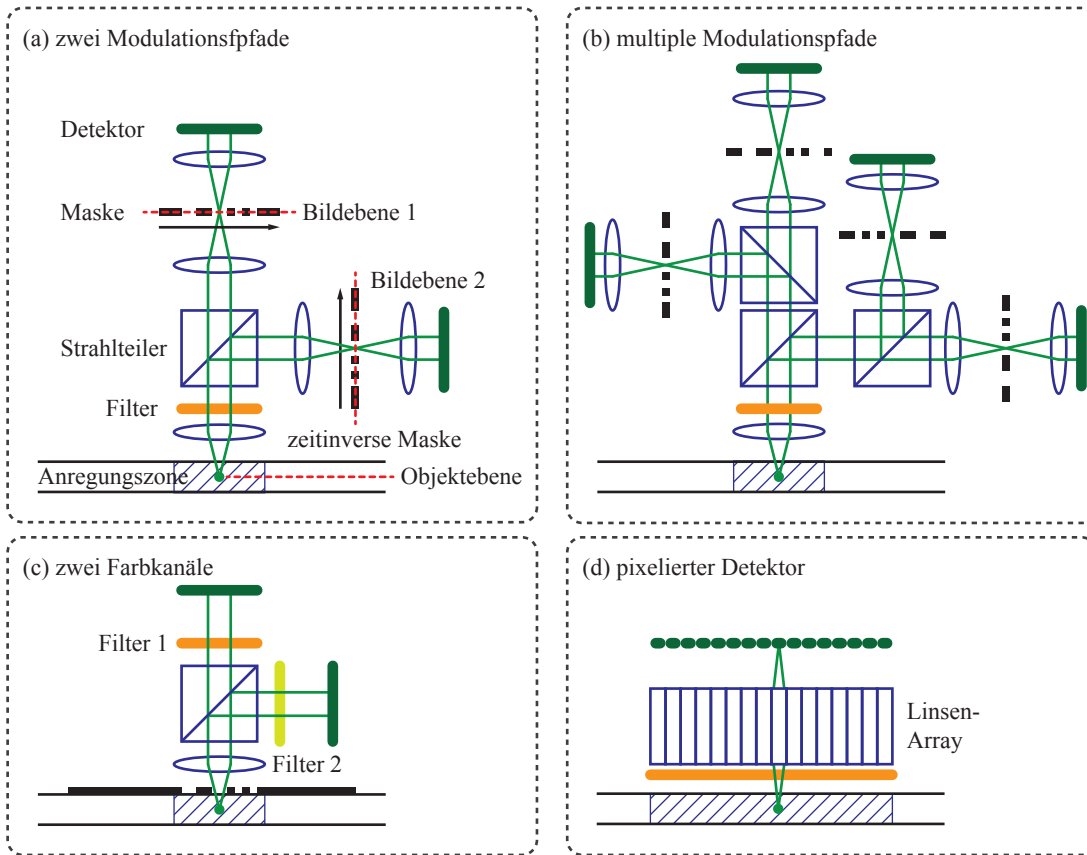


Abb. 2.7: Die Verwendung mehrerer Detektoren erlaubt eine wesentlich flexiblere Signalverarbeitung. In der einfachsten Variante wird das Fluoreszenzlicht auf zwei Kanäle aufgespalten, in denen verschiedene Modulationssequenzen (a) oder verschiedene Fluoreszenzfilter (c) zur Realisierung unterschiedlicher Farbkanäle eingesetzt werden. In Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität kann erneut eine Aufspaltung erfolgen, sodass sich weitere Modulationsschemata ergeben (b). Anstelle diskreter Detektoren können multiple Detektoren auch durch pixelierte Detektoren repräsentiert werden, bei denen jeder Pixel einem eigenen Kanal entspricht (d). Durch eine entsprechende analoge Verschaltung der Pixel oder spätere Software-Enkodierung können mit dieser Methode beliebige und sogar beliebig viele Modulationssequenzen gleichzeitig verwendet werden.

Die Aufspaltung des Fluoreszenzlichts in zwei Modulationspfade stellt die einfachste Variante der Realisierung dar. Dabei wird das Fluoreszenzlicht über einen Strahlteiler auf zwei verschiedene Masken abgebildet (Abb. 2.7 (a)), bevor es von zwei diskreten Detektoren erfasst wird. Die Masken können dabei völlig unterschiedlichen Sequenzen entsprechen, invers zueinander, oder zeitlich umgekehrt sein.

‘Invers’ bedeutet im Jargon der Arbeit, dass sich die Polarität der Maske umkehrt ($S \rightarrow \bar{S}$), d.h. dass es sich um das bitweise Komplement der Originalmaske handelt:

$$0 \rightarrow 1 \quad (15)$$

$$1 \rightarrow 0. \quad (16)$$

Durch die Erzeugung einer Modulationssequenz S und ihrer Inversen \bar{S} kann durch eine entsprechende Verschaltung der Signale ein bipolares Signal gewonnen werden (Abb. 2.8). Dazu wird das inverse Signal von dem nicht-inversen Signal subtrahiert. Besitzen beide Signalanteile unterschiedliche Signalloffsets c_S und $c_{\bar{S}}$, so ist das resultierende Signal von der Offset-Differenz $\Delta c = c_S - c_{\bar{S}}$ überlagert. Nach dem Schritt

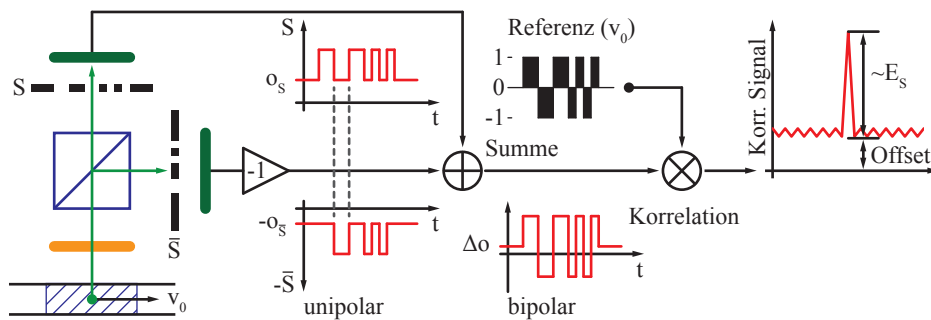


Abb. 2.8: Die Aufspaltung des Fluoreszenzlichtes kann dazu genutzt werden, bipolare Signale zu erzeugen. Dazu wird das Detektorsignal auf die Masken mit Sequenzen S und \bar{S} abgebildet. Das Signal, das \bar{S} enthält, wird zunächst invertiert, bevor es dem Detektorsignal mit S hinzuaddiert wird. Detektor-Offsets resultieren dabei in einer Offsetdifferenz Δc .

der Pulskompression äußert sich Δc höchstens als konstanter Wert (Kap. 3.3) im Korrelationssignal. Der Vorteil geeigneter bipolarer Sequenzen (sog. LABS, Kap. 3.6) besteht darin, dass eine Pulskompression mit äußerst niedrigen Signalnebenkeulen bereits durch eine einfache Autokorrelation erreicht werden kann. Für diese Art der Modulation muss daher kein aufwändiger Pulskompressionsfilter erzeugt werden.

Neben der inversen Maske \bar{S} kann auch eine zeitliche umgekehrte Maske S' verwendet werden. Dies bedeutet, dass die Sequenz vom Fluoreszenzlicht der Zellen in umgekehrter zeitlicher Richtung durchlaufen wird. Nachdem eine Zelle die Detektionszone passiert hat, stehen somit das Modulationssignal S , als auch das zeitlich umgekehrte Modulationssignal S' zur Verfügung. Aus beiden Signalen kann fortlaufend eine Kreuzkorrelation gebildet werden, die dann zu einer Pulskompression führt (Abb. 2.9, links). Sowohl S als auch S' müssen bei dieser Methode für eine kurze Zeit gespeichert werden, sodass die Kreuzkorrelation über die gesamte Länge der Sequenz erfolgen kann. Bei fester Abtastrate legt die Gesamtlänge des Speichers die Geschwindigkeit fest, auf die der Korrelationsvorgang resonant ist. Beispielsweise benötigt das Signal einer langsameren Zelle einen größeren Speicherbereich, als das einer schnelleren Zelle.

Da es sich bei beiden Signalanteilen um unipolare Signale handelt, weist das resultierende Korrelationssignal einen hohen Gleichspannungsanteil (engl. *direct current*, DC) auf. Dieser äußert sich einerseits in einem hohen Signaloffset des Korrelationssignals, als auch in einer dreieckförmigen Signalgestalt ('DC-lobe'). Diese Signalform ist charakteristisch für Korrelationssignale, die aus unipolaren Signalen gewonnen werden und erschwert die Detektion von gültigen Signalpeaks (siehe auch Kap. 3.6). Solche Korrelationssignale müssen deshalb einen weiteren Signalverarbeitungsschritt (z.B. Hochpass-Filter) durchlaufen, bevor sie einem Peakdetektor (Diskriminator) zugeführt werden.

Wird der Speicher ausreichend groß gewählt, kann durch geschickte Verschaltung der Speicherzellen eine Auflösung der Geschwindigkeit auf verschiedenen resonanten Kanälen erreicht werden (Abb. 2.9, rechts). Dabei werden Korrelationsergebnisse aus schnellen Kanälen (wenige Speicherzellen) für die Korrelation auf langsameren Kanälen wiederverwendet. Die effektive Länge des Speichers wächst somit von Kanal zu Kanal. Derjenige Geschwindigkeitskanal, der auf ein einlaufendes Signal resonant ist, liefert dann das beste Korrelationsergebnis.

Bevor die Kanäle direkt miteinander verglichen werden können, müssen die Ausgangssignale zunächst weitere Signalverarbeitungsschritte durchlaufen. Beispielsweise besitzt das Signal einer langsameren Zelle automatisch eine höhere Signalenergie (Kap. 3.3) und somit Peakhöhe als das Signal einer schnelleren Zelle. Aus diesem Grund wird durch eine entsprechende Normierung sichergestellt, dass Korrelationssignale nicht längenabhängig gewichtet werden. Da das Korrelationssignal auf einem schnellen Kanal früher vorliegt, als das eines langsameren Kanals, muss durch eine Signalverzögerung (z.B. in Form eines Speichers, Delay) zudem für eine zeitliche Synchronisation der Signale gesorgt werden. Ein Hochpass

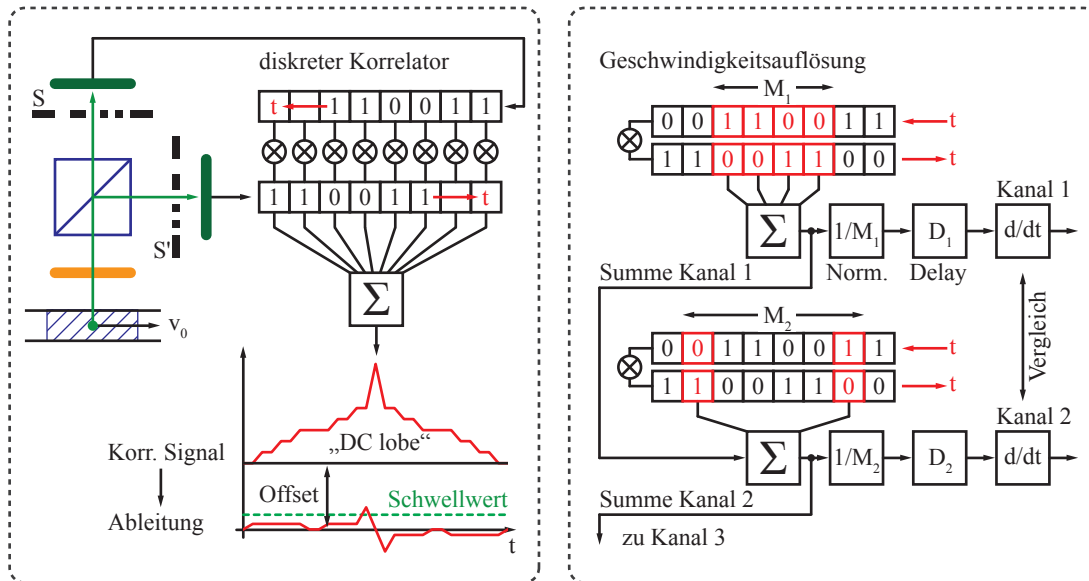


Abb. 2.9: Links: Die Aufspaltung des Fluoreszenzlichts in zwei Modulationskanäle erlaubt eine zeitinverse Implementierung S' der Sequenz S (links). Die Schattenmaske mit S wird dazu auf einem Pfad in umgekehrter Richtung orientiert, sodass eine vorbeilaufende Zelle das Modulationssignal in zeitlich umgekehrter Richtung liefert. Werden die Signale mit den Sequenzen S als auch S' für eine gewisse Dauer zwischengespeichert (FIFO), kann zwischen beiden Pfaden eine Kreuzkorrelation gebildet werden. Rechts: Die Länge des Speichers legt fest, auf welche Geschwindigkeit der jeweilige Kanal resonant ist. Zur Auflösung mehrerer Geschwindigkeitskanäle kann die Korrelation zunächst nur über einen Teil des Speichers erfolgen (schnellerer Kanal), um das Ergebnis für einen langsameren Kanal wiederzuverwenden. Somit kann der Hardware-Aufwand auf ein Minimum reduziert werden. Ein Vergleich der Kanäle kann erst dann erfolgen, wenn alle Korrelationsergebnisse normiert, von Signaloffsets befreit (Differenzierung) und zeitsynchron sind (Verzögerungsglied/Delay).

(z.B. Differenzierung) kann dann im Anschluss dazu verwendet werden, um die Korrelationssignale von Signaloffsets zu befreien, bevor ein Vergleich der Signalpeaks durch einen Diskriminator erfolgt.

Durch eine weitere Aufzweigung des Fluoreszenzlichtes auf vier Detektionspfade können die Vorteile bipolarer Sequenzen mit denen der Kreuzkorrelationsvariante kombiniert werden (Abb. 2.7 (b)). So besitzt das Korrelationssignal keinen dreieckförmigen Verlauf seines Untergrundes und ist im Falle von abgeglichenen Detektoren sogar offsetfrei. Der Differenzierungsschritt (Hochpass) wird so überflüssig und die Korrelationssignale können nach Normierung und Verzögerung sofort miteinander verglichen werden.

Wie bereits angedeutet, können auch pixelierte statt diskreter Detektoren zum Einsatz kommen. Pixelierte Detektoren mit ausreichend hoher Auflösung haben den Vorteil, dass das Licht nicht durch zusätzliche Optiken in diskrete optische Pfade aufgespalten werden muss. Trotzdem muss eine Abbildung des Fluoreszenzlichtes vorgenommen werden. Dies kann entweder über eine einzelne Linse mit ausreichend hohem NA oder über (GRIN-) Linsen-Arrays (Abb. 2.7 (d)) erfolgen. Grin-Linsen-Arrays werden beispielsweise in Flachbrettscannern oder in Linienscannern in der Industrie eingesetzt und sind daher gut verfügbar.

Für das pixelierte Detektionsverfahren kommen sogenannte Liniensensoren in Frage, die im Vergleich zu Flächensensoren wesentlich höhere Bildraten liefern. Verhältnismäßig günstige Liniensensoren sind als CMOS, CCD oder CCD-TDI (*engl. für time delayed integration*) Varianten erhältlich. Diese Detektoren sind als fertige Kameras erhältlich und durch Standardprotokolle einfach zu handhaben. Nachteilig ist hingegen die relativ geringe Quanteneffizienz geläufiger CCD-Sensoren. Teurere ladungsverstärkende

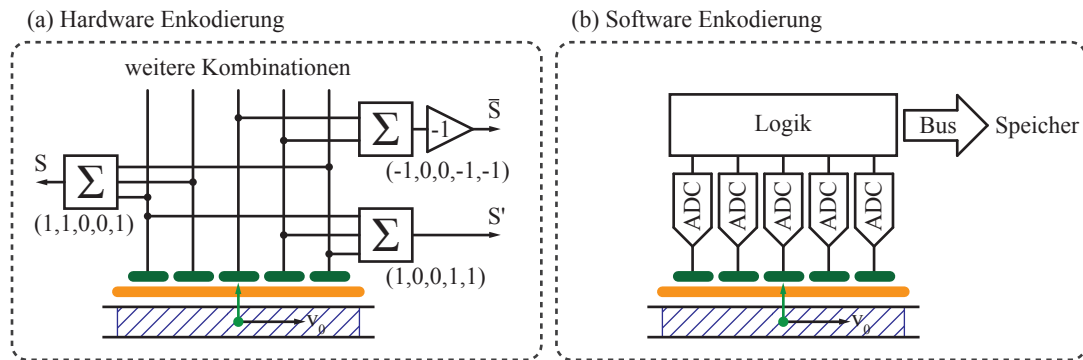


Abb. 2.10: Die Verwendung eines pixelierten Detektors ist die einfachste und flexibelste Variante, eine Modulation auf multiplen Kanälen vorzunehmen. Jeder Pixel entspricht dabei einem eigenen Kanal, der ein eigenes analoges Signal liefert. Diese Signale können entweder in Hardware so verschaltet werden, dass beliebig viele verschiedene Modulationssequenzen daraus resultieren (a) oder einzeln ausgelesen und digitalisiert werden (b). Der Vorteil einer frühzeitigen Digitalisierung besteht darin, dass auf den entstehenden Datensatz nachträglich beliebig viele Modulationssequenzen angewandt werden können.

EM-CCDs (engl. für *electron multiplying*) sind um ein Vielfaches empfindlicher, da sie aufwändig gekühlt sind. Aus Kostengründen kommen solche Detektoren für die spätere Anwendung nicht in Frage.

Eine echte Alternative stellen sogenannte SiPM (engl. für *silicon photo multiplier*) Module dar, die sehr kompakte Abmaße und eine Photonenverstärkung von 10^6 - 10^7 besitzen. Solche Module sind unwesentlich teurer als Liniendetektoren und sogar gekühlt verfügbar. Von ihrer Empfindlichkeit reichen sie an Photomultiplier heran, sind jedoch unempfindlich gegenüber Raumlicht, verzichten auf Hochspannungen und sind durch ihre Bauart deutlich einfacher zu handhaben (z.B. kein Glasgehäuse). Falls das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz in späteren Geräten (Serienfertigung) auf mehreren Modulationskanälen erfolgen soll, so stellt ein strukturierter SiPM nach jetzigem Stand der Kenntnis die beste Detektorvariante dar.

Im Gegensatz zu diskreten Detektoren ermöglichen pixelierte Detektoren nicht nur einen verhältnismäßig einfachen optischen Aufbau. Auch für die Signalverarbeitung bieten solche Detektoren eine enorme Flexibilität, da sich prinzipiell alle Modulationstechniken (Amplitudenmodulation) für diskrete auf pixelierte Detektoren übertragen lassen. Dies gelingt durch Zusammenschaltung einzelner Pixel zu größeren Regionen (Binning), wobei jede Region von ihren Ausmaßen einem Feature der implementierten binären Sequenz entspricht. Die Verschaltung dieser Pixel gelingt entweder in Hardware oder in Software.

Bei der Hardware-Verschaltung werden die analogen Signale einzelner Pixel über entsprechende Verstärker (Summierer) zu Regionen zusammengeschaltet und verschiedene Regionen (Bits) schließlich zu einer Gesamtsequenz. Für die Software-Verschaltung muss das analoge Signal jedes einzelnen Pixels zunächst in einen digitalen Wert gewandelt und gespeichert werden. Für die nachträgliche Auswertung können die Einzelsignale dann in beliebige Sequenzen transformiert werden. So können beispielsweise die Eigenschaften verschiedener Sequenzen auf dem gleichen Datensatz direkt miteinander verglichen oder Sequenzen mit verschiedenen Eigenschaften parallel zur Auswertung genutzt werden.

Sowohl die Hardware- als auch die Software-Enkodierung erlauben Mehrfach-Implementierungen zur gleichen Zeit. Welche und wieviele Codes gleichzeitig verwendet werden, ist eine Frage der Verschaltung bzw. des Rechenaufwandes.

3 Grundlagen der Signalverarbeitung

Nachdem in den vorherigen Kapiteln das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz inklusive verschiedener Realisierungsmöglichkeiten beschrieben wurde, wird in diesem Kapitel auf die Signalverarbeitung der Detektorsignale eingegangen. Dabei wird zunächst die theoretische Herleitung aller relevanten signaltheoretischen Prinzipien und Werkzeuge vorgenommen, bevor auf das eigentliche Filterdesign verschiedener Pulskompressionsfilter eingegangen wird. Die Herleitungen werden größtenteils anhand von zeitdiskreten Digitalsignalen vorgenommen, da die Signalverarbeitung digital erfolgt. An manchen Stellen wird jedoch der Einfachheit halber ein Wechsel in den zeitkontinuierlichen Bereich vorgenommen. Alle Definitionen, Rechnungen, Erklärungen und Beispiele in diesem Kapitel orientieren sich stark an den Referenzen [15], [16], [28] und [29].

3.1 Lineare zeitinvariante Systeme

Zeitdiskrete Digitalsignale sind definiert als eine Folge

$$x[n], n \in \mathbb{Z} \quad (17)$$

von Amplitudenwerten mit Laufindex n . Bei der Digitalisierung eines zeitkontinuierlichen, analogen Signals $x_a(t)$, wird die Signalamplitude dieses Signals zu diskreten Zeitpunkten $n\Delta t$ in Abständen Δt abgefragt:

$$x[n] = x_a(n\Delta t). \quad (18)$$

Δt bezeichnet die Abtast-Periode und die Abtastfrequenz f_s ist definiert durch:

$$f_s = \frac{1}{\Delta t}. \quad (19)$$

Eine wichtige Identität der digitalen Signalverarbeitung stellt die Delta-Distribution $\delta[n]$ dar:

$$\delta[n] = \begin{cases} 1 & \text{für } n = 0 \\ 0 & \text{für } n \neq 0. \end{cases} \quad (20)$$

Über die sogenannte Ausblende-Eigenschaft der Delta-Distribution lässt sich ein (unendlich langes) Signal $x[n]$ ausdrücken durch:

$$x[n] = \sum_{k=-\infty}^{\infty} x[k] \delta[n-k]. \quad (21)$$

Die Verarbeitung solcher zeitdiskreter Signale geschieht durch zeitdiskrete Systeme, die eine Eingangssequenz $x[n]$ gemäß einer Transformationsvorschrift $T\{\cdot\}$ in eine Ausgangssequenz $y[n]$ wandeln:

$$y[n] = T\{x[n]\}. \quad (22)$$

$y[n]$ wird dabei als Systemantwort der Eingangssequenz $x[n]$ bezeichnet. Man nennt ein System linear, wenn für Signalsuperpositionen und skalierte Eingangssignale gilt:

$$1. \quad T\{x_1[n] + x_2[n]\} = T\{x_1[n]\} + T\{x_2[n]\} = y_1[n] + y_2[n] \quad (23)$$

$$2. \quad T\{ax[n]\} = aT\{x[n]\} = ay[n]. \quad (24)$$

Prinzipiell lässt sich jedes Eingangssignal als Superposition vieler unabhängiger Signale auffassen, von denen jedes unterschiedlich skaliert ist:

$$x[n] = a_1x_1[n] + a_2x_2[n] + \dots \quad (25)$$

$$= \sum_k a_k x_k[n]. \quad (26)$$

Ein lineares System liefert dann eine Ausgangsfunktion $y[n]$ gemäß

$$y[n] = T\{x[n]\} = a_1T\{x_1[n]\} + a_2T\{x_2[n]\} + \dots \quad (27)$$

$$= \sum_k a_k y_k[n]. \quad (28)$$

Das System heißt zusätzlich zeitinvariant, wenn für eine Eingangssequenz $x_{n_0} = x[n - n_0]$ gilt:

$$y_{n_0} = T\{x_{n_0}\} = T\{x[n - n_0]\} = y[n - n_0]. \quad (29)$$

Dies bedeutet, dass eine Zeitverschiebung des Eingangssignals um n_0 die gleiche Zeitverschiebung im Ausgangssignal hervorruft. Ist das System sowohl linear als auch zeitinvariant, so wird das System als lineares, zeitinvariantes (*engl. linear and time invariant, LTI*) System bezeichnet. LTI-Systeme können vollständig über ihre Impulsantwort, d.h. Systemantwort auf einen Delta-Impuls, charakterisiert werden, da sich ein Eingangssignal $x[n]$ immer als Superposition verschieden skalierten und zeitverzögerter Impulse darstellen lässt (Gl. 21).

Sei $h_k[n]$ die Systemantwort auf die Deltafunktion $\delta[n - k]$, dann gilt:

$$y[n] = T\{x[n]\} \quad (30)$$

$$= T\left\{\sum_{k=-\infty}^{\infty} x[k] \delta[n - k]\right\} \quad (31)$$

$$= \sum_{k=-\infty}^{\infty} x[k] T\{\delta[n - k]\} \quad (32)$$

$$= \sum_{k=-\infty}^{\infty} x[k] h_k[n]. \quad (33)$$

Für ein zeitinvariantes System (Gl. 29) lässt sich dies umformen zu

$$y[n] = \sum_{k=-\infty}^{\infty} x[k]h[n-k]. \quad (34)$$

Ist $x[n]$ und insbesondere $h[n]$ für alle n bekannt, so kann gemäß Gl. 34 auch $y[n]$ für alle Zeitpunkte n berechnet werden. Gl. 34 wird auch als Faltungssumme oder Faltungsintegral bezeichnet und bildet die Grundlage der Digitalen Signalverarbeitung. Die Faltungssumme wird abgekürzt geschrieben als

$$y[n] = x[n] * h[n]. \quad (35)$$

Für die Faltungssumme gelten verschiedene Gesetzmäßigkeiten, die bei der späteren Verwendung von Nutzen sind:

$$\text{Kommutativgesetz: } x[n] * h[n] = h[n] * x[n] \quad (36)$$

$$\text{Distributivgesetz: } x[n] * (h_1[n] + h_2[n]) = x[n] * h_1[n] + x[n] * h_2[n] \quad (37)$$

$$\text{Assoziativgesetz: } y[n] = (x[n] * h_1[n]) * h_2[n] = x[n] * (h_1[n] * h_2[n]) \quad (38)$$

Die Gesetzmäßigkeiten aus Gl. 37 und Gl. 38 können anhand einer Skizze (Abb. 3.1) leicht verdeutlicht werden.

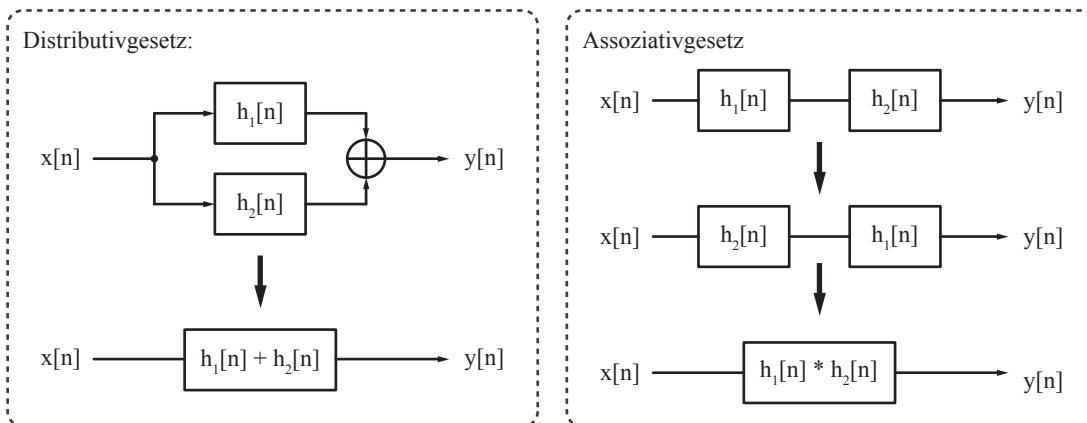


Abb. 3.1: Links: Durchläuft ein Signal $x[n]$ zwei getrennte LTI-Systeme, deren Systemantworten addiert werden, so können beide Systeme durch Superposition ihrer Impulsantworten zusammengefasst werden. Rechts: Wenn das Signal mehrerer LTI-Systeme nacheinander passiert, so spielt es keine Rolle, in welcher Reihenfolge die Systeme angeordnet sind. Durch Faltung ihrer Impulsantworten können Teilsysteme zu einem Gesamtsystem zusammengefasst werden.

Ein LTI-System ist stabil, wenn die Summe B über alle $|h[k]|$ beschränkt ist:

$$B = \sum_k |h[k]| < \infty. \quad (39)$$

Dies ist bei Systemen mit endlich langer Impulsantwort immer der Fall, sofern jeder der Werte $h[k]$ in seiner Amplitude beschränkt ist. Alle in dieser Arbeit besprochenen Systeme (Filter) erfüllen dieses Kriterium und werden als Filter mit endlicher Impulsantwort (engl. *finite impulse response filter*, *FIR*) bezeichnet.

3.2 Digitale Filterung

Die Digitale Filterung lässt sich am besten anhand eines komplexen Signals

$$x(t) = e^{i2\pi f t} \quad (40)$$

erläutern, das in äquidistanten Zeitschritten Δt abgefragt und digitalisiert wird. Man erhält dadurch ein zeitdiskretes Signal gemäß:

$$x[n] = e^{i2\pi f n \Delta t} \quad (41)$$

$$= e^{i2\pi \frac{f}{f_s} n} \quad (42)$$

$$= e^{i\omega n}. \quad (43)$$

$\omega = 2\pi \frac{f}{f_s}$ wird als normierte Frequenz in der Einheit rad bezeichnet. Durchläuft $x[n]$ ein LTI-System mit Impulsantwort $h[k]$, so erhält man nach Gl. 34 das Ausgangssignal

$$y[n] = x[n] * h[n] \quad (44)$$

$$= \sum_{k=-\infty}^{\infty} x[k] h[n-k] \quad (45)$$

$$\stackrel{\text{Gl. 36}}{=} \sum_{k=-\infty}^{\infty} x[n-k] h[k] \quad (46)$$

$$= \sum_{k=-\infty}^{\infty} e^{i\omega(n-k)} h[k] \quad (47)$$

$$= \sum_{k=-\infty}^{\infty} h[k] e^{-i\omega k} e^{i\omega n} \quad (48)$$

$$= H(e^{i\omega}) e^{i\omega n}. \quad (49)$$

Die komplexe Größe $H(e^{i\omega})$ ist ein Eigenwert des LTI-Systems und wird als Frequenzantwort des Systems bezeichnet. Wie jede komplexe Zahl (bis auf 0) lässt sich $H(e^{i\omega})$ in Polardarstellung als reelle Zahl (Amplitude) und einem Phasenwinkel $\angle H(i\omega)$ angeben:

$$H(e^{i\omega}) = |H(e^{i\omega})| e^{i\angle H(i\omega)}. \quad (50)$$

Im Allgemeinen erfährt jedes komplexe Signal beim Durchlaufen eines LTI-Systems eine Änderung seiner Amplitude und Phasenlage.

Prinzipiell können mit der Frequenzantwort $H(e^{i\omega})$ nicht nur LTI-Systeme auf ihre spektralen Eigenschaften hin untersucht werden, sondern auch beliebige Signale $x[n]$. Dies gelingt durch die diskrete Fourier-Transformation (DFT), die gegeben ist durch:

$$X(e^{i\omega}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} x[n] e^{-i\omega n}. \quad (51)$$

Analog dazu ist die inverse Fourier-Transformation (iDFT) definiert zu:

$$x[n] = \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^{\pi} X(e^{i\omega}) e^{i\omega n} d\omega. \quad (52)$$

Die Fouriertransformierte $X(e^{i\omega})$ eines Signals $x[n]$ existiert immer dann, wenn gilt:

$$|X(e^{i\omega})| < \infty. \quad (53)$$

Über die Dreiecksungleichung lässt sich daraus eine Bedingung an die Werte der Sequenz $x[n]$ finden:

$$|X(e^{i\omega})| = \left| \sum_{n=-\infty}^{\infty} x[n] e^{-i\omega n} \right| \quad (54)$$

$$\leq \sum_{n=-\infty}^{\infty} |x[n]| |e^{-i\omega n}| \quad (55)$$

$$\leq \sum_{n=-\infty}^{\infty} |x[n]| < \infty \quad (56)$$

Dies bedeutet, dass alle Werte $x[n]$ eines Signals absolut summierbar sein müssen und die Summe nicht gegen Unendlich konvergiert.

Ist sowohl die Frequenzantwort eines LTI-Systems, als auch die Fourier-Transformierte einer Eingangssequenz $x[n]$ bekannt, so lässt sich über die Beziehung

$$Y(e^{i\omega}) = H(e^{i\omega}) X(e^{i\omega}) \quad (57)$$

direkt auf das Frequenzspektrum $Y(e^{i\omega})$ des Ausgangssignals $y[n]$ schließen. Ein weiterer wichtiger Zusammenhang zwischen Zeit- und Frequenzbereich ist durch das Parsevalsche Theorem gegeben durch

$$\sum_{n=-\infty}^{\infty} |x[n]|^2 = \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^{\pi} |X(e^{i\omega})|^2 d\omega. \quad (58)$$

Ein Beispiel für ein digitales Filter ist das sogenannte ‘moving average’ Filter, das den gleitenden Durchschnitt eines Signals bildet (Abb. 3.2). Dabei wird ein Eingangssignal $x[n]$ fortlaufend über ein endliches Intervall diskreter Werte summiert. In Abhängigkeit der Länge N des Intervalls, muss jeder Summand entsprechend dieser Länge normiert werden.

Man kann sich leicht davon überzeugen, dass die Impulsantwort des Filters gegeben ist durch

$$h[k] = \begin{cases} \frac{1}{M+1} & \text{für } 0 \leq k \leq M \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (59)$$

Daraus lässt sich die Frequenzantwort des LTI-Systems einfach bestimmen:

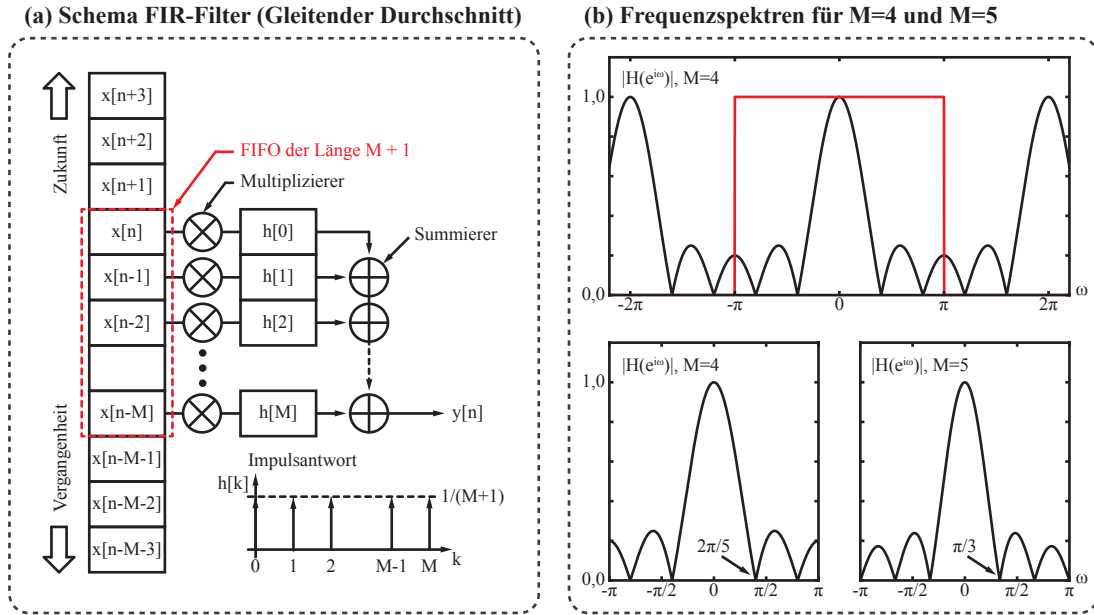


Abb. 3.2: (a) Die zeitdiskrete Filterung, z.B. Glättung des Signals durch Bilden des gleitenden Durchschnitts, kann z.B. durch ein FIR-Filter erfolgen. Dieser Filtertyp besteht aus einer entsprechenden Zahl an Signal-speichern, Multiplizieren und Addieren. (b) Das Frequenzverhalten des Filters ist durch seine Impulsantwort und Länge gegeben (siehe Text) und kann durch eine diskrete Fouriertransformation ermittelt werden. Für verschiedene Längen des Filters ergeben sich, bezogen auf die Abtastfrequenz, verschiedene Frequenzspektren seiner Übertragungsfunktion $|H(e^{j\omega})|$.

$$H(e^{j\omega}) = \frac{1}{M+1} \sum_{k=0}^M e^{-j\omega k}. \quad (60)$$

Durch Verwenden der Identität

$$\sum_{N_1}^{N_2} \alpha^k = \frac{\alpha^{N_1} - \alpha^{N_2+1}}{1 - \alpha} \quad (61)$$

lässt sich Gl. 60 umformen zu

$$H(e^{j\omega}) = \sum_{k=0}^M e^{-j\omega k} = \frac{1 - e^{-j\omega(M+1)}}{1 - e^{-j\omega}} \quad (62)$$

$$= \frac{1}{M+1} \frac{(e^{j\omega(M+1)/2} - e^{-j\omega(M+1)/2}) e^{-j\omega(M+1)/2}}{(e^{j\omega/2} - e^{-j\omega/2}) e^{-j\omega/2}} \quad (63)$$

$$= \frac{1}{M+1} \frac{\sin(\frac{M+1}{2}\omega)}{\sin(\frac{\omega}{2})} e^{-j\omega(M+1)/2}. \quad (64)$$

Daraus kann die Amplitude der Frequenzantwort mit

$$|H(e^{j\omega})| = \left| \frac{1}{M+1} \frac{\sin(\frac{M+1}{2}\omega)}{\sin(\frac{\omega}{2})} \right| \quad (65)$$

leicht abgelesen werden und ist für $M = 4$ und $M = 5$ in Abb. 3.2 (b) dargestellt. Da $H(e^{i\omega})$ periodisch in 2π ist, genügt es, das Intervall für ω im Bereich $[-\pi, \pi]$ anzugeben. Auf die Darstellung der Phase der Frequenzantwort wird an dieser Stelle verzichtet. Wie aus diesem Beispiel und Gl. 34 hervorgeht, lassen sich digitale Filter aus Speicherzellen (FIFO), Multiplizierern und Summierern realisieren.

Der einfache Aufbau des ‘moving average’-Filters ist insbesondere zum Verständnis des Zeit-Bandbreitenprodukts in Kap. 3.5 hilfreich.

3.3 DC- und Rauschverstärkung digitaler Filter

Die DC- und Rauschverstärkung digitaler Filter spielen für das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz eine besondere Rolle. Beispielsweise müssen Signaloffsets (Gleichanteile) des Messsignals eliminiert werden, um verschiedene Geschwindigkeitskanäle direkt miteinander vergleichen zu können. Eine hohe Rauschunterdrückung ist die Voraussetzung für eine hohe Sensitivität des Messprinzips. Gleichzeitig muss die eigentliche Zellsignatur im Messsignal durch das Filter so gut wie möglich verstärkt werden.

Vereinfacht lässt sich das Messsignal $x[n]$ als Superposition aus Zellsignatur $s[n]$, Weißem Rauschen $\epsilon[n]$ und einem konstanten Signaloffset $c[n] = \mu_c$ behandeln. Vor allem die Annahme, dass es sich bei dem Rauschen um rein Weißes Rauschen handelt ist legitim, da die Frequenzantworten der verwendeten Filter ein Bandpassverhalten zeigen. Somit werden nicht nur Gleichanteile, sondern auch niederfrequente Rauschanteile, die beispielsweise durch $1/f$ -Rauschen dominiert sind, stark unterdrückt. Das Messsignal lässt sich daher ausdrücken über:

$$x[n] = s[n] + \epsilon[n] + \mu_c. \quad (66)$$

Da die Signalverarbeitung durch ein FIR-Filter (LTI-System) erfolgt, können alle Signalanteile nach Gl. 37 unabhängig voneinander betrachtet werden.

Bei dem eigentlichen Nutzsignal $s[n]$ handelt es sich um ein zeitlich begrenztes Signal, das zudem wertbeschränkt ist [29]. Solche Signale können anhand ihrer Signalenergie E charakterisiert werden, die für ein diskretes Signal berechnet wird, über:

$$E = \sum_{k=-\infty}^{\infty} |x[k]|^2. \quad (67)$$

Signale werden als ‘Energiesignale’ bezeichnet, wenn $E < \infty$. Beispiele hierfür sind einzelne Pulse, Fenster aus mehreren Pulsen oder allgemein die Signale der Klasse der quadrat-integrierbaren Funktionen.

Da es sich bei konstanten Signaloffsets und additivem Rauschen um zeitlich unbegrenzte Signalanteile handelt, die im Unendlichen nicht verschwinden, werden solche Signale anhand ihrer mittleren Leistung über ein zeitliches Intervall gewisser Länge charakterisiert:

$$P = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{2n+1} \sum_{k=-n}^n |x[k]|^2. \quad (68)$$

Nach dieser Definition werden Signale als ‘Leistungssignale’ bezeichnet, wenn $0 < P < \infty$ ist.

Leistungssignale werden als weitestgehend stationär (oder schwach stationär) bezeichnet [30], wenn mindestens eine Kenngröße der Signale zeitlich unabhängig ist. Dabei kann es sich beispielsweise um den arithmetischen Mittelwert der Signalamplitude (*engl. mean value*) oder die Varianz eines Zufallssignals (Rauschen) handeln.

Durchläuft ein stationäres Leistungssignal ein LTI-System, so interessieren in der Regel nicht die spezifischen Ausgangswerte $y[n]$ des Systems, sondern die Erwartungswerte $\mathcal{E}\{\cdot\}$ einer oder mehrerer Kenngrößen des Signals.

Beispielsweise lässt sich für ein konstantes Eingangssignal $x[n] = \mu_c$ der Erwartungswert des konstanten Signaloffset μ_y des Ausgangssignals $y[n]$ eines FIR-Filters der Länge N berechnen über:

$$\mu_y = \mathcal{E}\{y[n]\} = \sum_{k=0}^{N-1} h[k] \mathcal{E}\{x[n-k]\} \quad (69)$$

$$= \mu_c \sum_{k=0}^{N-1} h[k]. \quad (70)$$

Dies bedeutet, dass der mittlere Signaloffset μ_y des Ausgangssignals $y[n]$ einerseits vom Offset μ_c des Eingangssignals abhängt und andererseits durch die (endliche) Summe über alle Filterkoeffizienten $h[k]$ beeinflusst wird.

Eine weitere Umformung von Gl. 70 resultiert in:

$$\mu_y = \mu_c \sum_{k=0}^{N-1} 1 h[k] \quad (71)$$

$$= \mu_c \sum_{k=0}^{N-1} e^{i0} h[k] \quad (72)$$

$$= \mu_c H(e^{i\omega})|_{\omega=0}. \quad (73)$$

Das heißt, dass die Summe über alle Filterkoeffizienten $h[k]$ dem Verstärkungsfaktor des Filters bei $\omega = 0$ (Gleichverstärkung) entspricht. Die Gleich- bzw. DC-Verstärkung A_{DC} des FIR-Filters der Länge N ist daher gegeben durch:

$$A_{DC} = \sum_{k=0}^{N-1} h[k]. \quad (74)$$

Zur Berechnung der Rauschverstärkung (Weißes Gaußsches Rauschen) genügt es nicht alleine den Erwartungswert des stochastischen Eingangssignals $\epsilon[n]$ zu betrachten, da dieser per Definition ohnehin Null ist:

$$\mu_\epsilon = \mathcal{E}\{\epsilon[n]\} = 0. \quad (75)$$

Daraus folgt für den Erwartungswert eines (unendlich langen) Eingangssignals $x[n]$, dem nach Gl. 66 ein Signaloffset und Rauschen überlagert ist:

$$\mathcal{E}\{y[n]\} = \sum_{k=-\infty}^{\infty} \mathcal{E}\{x[n-k]\} h[k] \quad (76)$$

$$= \sum_{k=-\infty}^{\infty} \mathcal{E}\{s[n-k] + \epsilon[n-k] + c[n-k]\} h[k] \quad (77)$$

$$= \sum_{k=-\infty}^{\infty} \mathcal{E}\{s[n-k]\} + \underbrace{\mathcal{E}\{\epsilon[n-k]\}}_0 + \mathcal{E}\{c[n-k]\} h[k] \quad (78)$$

$$= \sum_{k=-\infty}^{\infty} s[n-k] h[k] + \mu_c A_{DC}. \quad (79)$$

Zur Bewertung der Rauschamplitude nach Durchlaufen eines LTI-Systems wird, anstelle des Erwartungswertes für die Signalamplitude, der Erwartungswert der Varianz σ_y^2 des Ausgangssignals herangezogen. Um die Berechnung von $\mathcal{E}\{\sigma_y^2\}$ überschaubar zu halten, wird auf einen zusätzlichen Signaloffset verzichtet. Man erhält:

$$\mathcal{E}\{\sigma_y^2\} = \mathcal{E}\left\{\left[\sum_{k=0}^{N-1} \underbrace{(s[n-k] + \epsilon[n-k])}_{x[n-k]} h[k] - \mathcal{E}\{y[n]\}\right]^2\right\} \quad (80)$$

Nimmt man Gl. 75 zu Hilfe ($\mu_\epsilon = 0$), vereinfacht sich $\mathcal{E}\{y[n]\}$ in Gl. 80 zu

$$\mathcal{E}\{y[n]\} = \sum_{k=0}^{N-1} s[n-k] h[k]. \quad (81)$$

Es resultiert:

$$\mathcal{E}\{\sigma_y^2\} = \mathcal{E}\left\{\left[\sum_{k=0}^{N-1} \epsilon[n-k] h[k]\right]^2\right\} \quad (82)$$

$$= \mathcal{E}\left\{\sum_{k=0}^{N-1} \epsilon[n-k] h[k] \sum_{m=0}^{N-1} \epsilon[n-m] h[m]\right\}. \quad (83)$$

Zur Unterscheidung der Summen in Gl. 83 werden verschiedene Laufindizes k und m gewählt. Für unkorreliertes Rauschen gilt zu den Zeitpunkten k und m :

$$\mathcal{E}\{\epsilon[k]\epsilon[m]\} = \begin{cases} \sigma_n^2 & \text{für } k = m \\ 0 & \text{für } k \neq m. \end{cases} \quad (84)$$

σ_n bezeichnet dabei die Standardabweichung des Rauschens.

Nach obiger Bedingung tragen nur solche Terme zum Ausdruck in Gl. 83 bei, für die $k = m$ gilt. Es resultiert:

$$\mathcal{E}\{\sigma_y^2\} = \sum_{k=0}^{N-1} h[k]^2 \mathcal{E}\{\epsilon[k]^2\} \quad (85)$$

$$= \sigma_n^2 \sum_{k=0}^{N-1} h[k]^2. \quad (86)$$

Die Wurzel aus der Summe über die Quadrate aller Filterkoeffizienten $h[k]$ ist nach Gl. 86 ein Maß für die Rauschverstärkung (Amplitude) eines Filters und wird mit A_N bezeichnet:

$$A_N = \sqrt{\sum_{k=0}^{N-1} h[k]^2}. \quad (87)$$

3.4 Optimalfilterung

Eine der Hauptaufgaben der digitalen Signalverarbeitung liegt darin, das SNR der Fluoreszenzsignale durch geeignete digitale Filter soweit zu optimieren, dass eine eindeutige Detektion der Signale vor einem starken Rauschhintergrund möglich wird. Dies lässt sich durch die bereits angesprochene Puls-kompression erreichen, bei der die Signalamplitude kurzzeitig stark erhöht wird, während das Rauschen gleichzeitig unterdrückt wird.

Wie in [28] und [31] beschrieben, ist der genaue Verlauf des gefilterten Signals ohne größere Bedeutung, wenn das Hauptanliegen der Signalverarbeitung nur darin besteht, einen möglichst hohen SNR-Gewinn zu erzielen. Ein Filter, das dieser Anforderung gerecht wird, wird als Optimalfilter (engl. matched filter) bezeichnet. Seine Funktionsweise besteht darin, die gesamte Signalenergie E des erwarteten Signals (Gl. 67) zu speichern und in einem kurzen Zeitintervall abzugeben (Abb. 3.3). Mathematisch gesehen liefert das Optimalfilter auf das erwartete Eingangssignal $s(t)$ (z.B. Zellsignatur) einen Signalverlauf $g(t)$, der zu einem Zeitpunkt t_0 so stark überhöht wird, dass die Amplitude $g(t_0)$ klar über das Rauschniveau tritt.

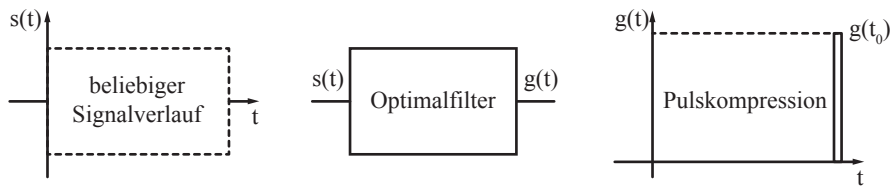


Abb. 3.3: Schema der Optimalfilterung. Unabhängig vom Signalverlauf des Eingangssignals komprimiert ein Optimalfilter die Signalenergie des Eingangssignals für einen kurzen Zeitpunkt. Mathematisch lässt sich zeigen, dass unter allen Filtern nur das Optimalfilter in der Lage ist, das SNR zu maximieren.

Der maximal mögliche SNR-Gewinn SNR_{\max} , der durch Optimalfilterung erreicht werden kann, wird in der Nachrichtentechnik allgemein als Verhältnis aus Signalspitzenleistung $|g(t_0)|^2$ und zeitunabhängiger, mittlerer Rauschleistung σ_y^2 (Varianz des Rauschens des Ausgangssignals) definiert

$$SNR_{\max} = \frac{|g(t_0)|^2}{\sigma_y^2}. \quad (88)$$

Da das Ziel des Optimalfilters mit der SNR-Maximierung klar vorgegeben ist, muss geklärt werden, von welcher Gestalt das Optimalfilter ist und wie es sich herleiten lässt.

Zum leichteren Verständnis wird die folgende Herleitung des Optimalfilters im Zeitkontinuierlichen vorgenommen. Dazu werden sowohl die maximale Signalamplitude $g(t_0)$, als auch die mittlere Rauschleistung σ_y^2 des Ausgangssignals, zunächst durch die inverse Fourier-Transformation 52 der Frequenzantwort $H(e^{i\omega})$ des Filters ausgedrückt. Bei $g(t)$ gelingt dies durch Verwenden der Identität in Gl. 57 und bei σ_y^2 durch Ausnutzen des Parsevalschen Theorems in Gl. 58.

$$g(t_0) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} H(e^{i\omega}) S(e^{i\omega}) e^{i\omega t_0} d\omega \quad (89)$$

$$\sigma_y^2 = \frac{N_0}{2} \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} |H(e^{i\omega})|^2 d\omega. \quad (90)$$

$S(e^{i\omega})$ bezeichnet dabei die Fourier-Transformierte des Eingangssignals $s(t)$, $N_0/2$ steht für die spektrale Leistungsdichte des Rauschens. Für das maximale SNR erhält man damit:

$$SNR_{\max} = \frac{\left| \int_{-\infty}^{\infty} H(e^{i\omega}) S(e^{i\omega}) e^{i\omega t_0} d\omega \right|^2}{\pi N_0 \int_{-\infty}^{\infty} |H(e^{i\omega})|^2 d\omega}. \quad (91)$$

Auf Gl. 91 lässt sich die Schwartzsche Ungleichung für komplexe Signale anwenden [32]:

$$\left| \int_{-\infty}^{\infty} A(e^{i\omega}) B(e^{i\omega}) d\omega \right|^2 \leq \int_{-\infty}^{\infty} |A(e^{i\omega})|^2 d\omega \int_{-\infty}^{\infty} |B(e^{i\omega})|^2 d\omega \quad (92)$$

Die Gleichheitsbedingung in Gl. 92 wird nur dann erfüllt, wenn

$$A(e^{i\omega}) = K B^*(e^{i\omega}) \quad (93)$$

gilt, wobei K eine beliebige Konstante ist. Wählt man für obige Berechnung

$$A(e^{i\omega}) = H(e^{i\omega}) \quad (94)$$

$$B(e^{i\omega}) = S(e^{i\omega}) e^{i\omega t_0}, \quad (95)$$

so erhält man für Gl. 91:

$$SNR_{\max} = \frac{1}{\pi N_0} \int_{-\infty}^{\infty} |S(e^{i\omega})|^2 d\omega. \quad (96)$$

Durch das Parsevalsche Theorem (Gl. 58) und Gl. 67 lässt sich dies weiter vereinfachen zu

$$SNR_{\max} = \frac{2E}{N_0}, \quad (97)$$

wobei E die Energie des Eingangssignals $s(t)$ ist. Demnach wird das maximale SNR (Gl. 97) nur dann erreicht, wenn das Ausgangssignal des Optimalfilters der Signalenergie entspricht. Nach Gl. 93 kann dies nur dann erreicht werden, wenn das Filter das gleiche Frequenzspektrum wie das erwartete Eingangssignal besitzt:

$$H(e^{i\omega}) = K S^*(e^{i\omega}) e^{-i\omega t_0}. \quad (98)$$

Wendet man die inverse Fourier-Transformation auf Gl. 98 an, so erhält man die Impulsantwort $h_m(t)$ des Optimalfilters mit

$$h_m(t) = K s^*(t_0 - t). \quad (99)$$

Der Phasenfaktor $e^{-i\omega t_0}$ in Gl. 98 bzw. die Zeitverschiebung t_0 in Gl. 99 resultieren aus der Signallaufzeit des Optimalfilters. t_0 muss stets gleich oder länger als das erwartete Signal sein, damit $h(t) = 0$ für $t < 0$ gilt und das Filter kausal ist. Die Impulsantwort stellt somit das zeitgespiegelte, skalierte und komplex-konjugierte Pendant zum erwarteten Signalverlauf dar. Anhand der Gleichungen 97 und 99 lässt sich weiterhin erkennen, dass der maximale SNR-Gewinn durch das Optimalfilter nicht vom Verlauf des Eingangssignals abhängt, sondern nur von seiner Energie.

Nach Gl. 99 erhält man für ein Eingangssignal $s(t)$ das Ausgangssignal $g(t)$ des Optimalfilters [28] mit

$$g(t) = h_m(t) * s(t) = K s^*(t_0 - t) * s(t) \quad (100)$$

$$= K \int_{-\infty}^{\infty} s^*(t_0 - \Theta) s(t - \Theta) d\Theta. \quad (101)$$

Man substituiert: $\Theta' = t_0 - \Theta \longrightarrow d\Theta' = -d\Theta$, sodass

$$g(t) = -K \int_{\infty}^{-\infty} s^*(\Theta') s(t - (t_0 - \Theta')) d\Theta' \quad (102)$$

$$= K \int_{-\infty}^{\infty} s^*(\Theta') s(t - t_0 + \Theta') d\Theta'. \quad (103)$$

Für $\tau = t - t_0$ folgt daraus:

$$g(\tau) = g(t = \tau + t_0) = K \int_{-\infty}^{\infty} s^*(\Theta') s(\tau + \Theta') d\Theta'. \quad (104)$$

Fasst man Θ' als Zeitvariable auf und benennt sie erneut mit t , erhält man die Autokorrelationsfunktion (AKF) von $s(t)$ mit

$$g(\tau) = R_{ss}(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} s^*(t) s(t + \tau) dt. \quad (105)$$

Hierbei wird vorausgesetzt, dass es sich bei $s(t)$ um ein reelles Signal handelt.

Die AKF lässt sich interpretieren als Ähnlichkeitsmaß des um τ zeitverschobenen Signals $s(t)$ mit sich selbst. Für $\tau = 0$ sind beide Signale $s(t)$ deckungsgleich und die AKF liefert die Signalenergie. Durch die Laufzeit des Optimalfilters tritt dieser Fall zum Zeitpunkt $t = t_0$ ein, d.h. wenn sich das Signal vollständig im Filter befindet. Da die AKF symmetrisch um t_0 ist und t_0 in der Regel der Länge des Eingangssignals entspricht, besitzt $R_{ss}(\tau)$ die doppelte Länge des Eingangssignals.

Aus vorangegangenen Rechnungen lassen sich zusammenfassend einige wichtige Schlussfolgerungen ziehen, die zum Verständnis der Signalverarbeitung in dieser Arbeit von großer Bedeutung sind:

1. Die Maximierung des SNR erfordert einen Filter mit dem gleichen (oder proportionalen) Frequenzspektrum wie das erwartete Eingangssignal.
2. Dadurch besitzt das Filter im Zeitbereich die gleiche oder eine ähnliche Gestalt wie das erwartete Signal (Optimalfilter).
3. Es kann gezeigt werden, dass die Impulsantwort des Filters zur Impulsfolge des Signals zeitlich umgekehrt sein muss.
4. Eine SNR-Maximierung erfolgt daher durch eine Autokorrelation, wobei das Korrelationsmaximum der Signalenergie entspricht.
5. Der SNR-Gewinn durch Optimalfilterung hängt nur von der Signalenergie und nicht vom zeitlichen Verlauf des Eingangssignals ab.

Neben der Autokorrelationsfunktion (AKF) kann auch allgemein die Kreuzkorrelation (KKF) definiert werden, die die Ähnlichkeit zwischen zwei unterschiedlichen Signalen bestimmt. Sie ist für zwei reelle Signale $u(t)$ und $v(t)$ definiert mit:

$$R_{uv}(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} u(t) v(t + \tau) dt. \quad (106)$$

Analog zur zeitkontinuierlichen Notation, kann die KKF für reelle Signale auch zeitdiskret dargestellt werden:

$$R_{uv}[n] = \sum_{k=-\infty}^{\infty} u[k] v[n + k]. \quad (107)$$

Für $u = v$ resultiert aus Gl. 107 die Autokorrelation und somit die zeitdiskrete Optimalfilterung. Anhand des Beispiels in Abb. 3.4) wird verdeutlicht, wie eine Optimalfilterung für positive Signalverzögerungen von $n = 3$ bis $n = 0$ verläuft. Die Länge L des gesamten Korrelationssignals beträgt $L = M + N - 1$, wenn M und N die Längen der beteiligten zeitdiskreten Signale sind. Dementsprechend besitzt ein diskretes Autokorrelationssignal ($M = N$) die Länge $2N + 1$.

Autokorrelation $R_{ss}[n]$ für $n = 3$ bis $n = 0$

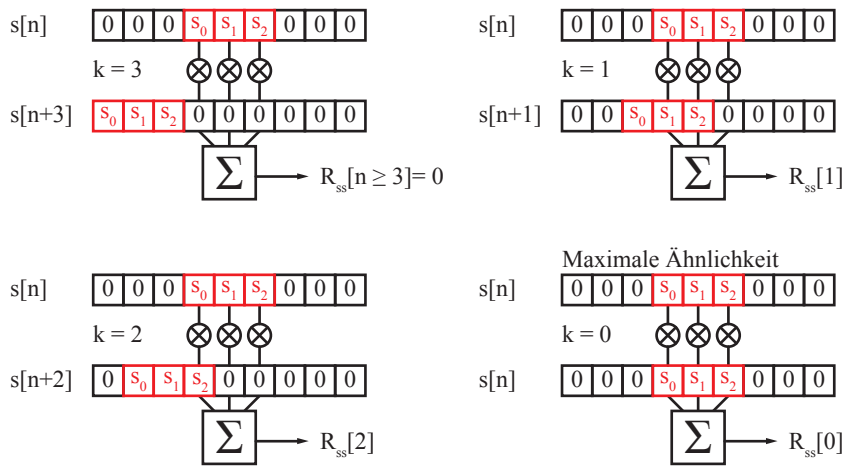


Abb. 3.4: Beispiel einer Autokorrelationsfunktion für ein Signal $s[n]$ der Länge $N = 3$ für positive Signalverzögerungen. Da das Signal für Verzögerungen $n \neq 0$ per Zero-Padding erweitert wird, trägt nur der Überlapp beider Signale zum Korrelationsergebnis bei. Somit reicht es aus, den Verschiebeparameter k in den Grenzen $[-2, 2]$ zu betrachten. Die resultierende Länge des diskreten Autokorrelationssignals beträgt $5 (= 2N - 1)$.

3.5 Zeit-Bandbreiten-Produkt

In dem vorherigem Abschnitt wurde gezeigt, dass das SNR eines Signals durch Optimalfilterung maximiert werden kann. Der Spitzenwert des SNR wird dabei durch die Signalenergie und nicht durch den zeitlichen Verlauf eines Eingangssignals festgelegt. Dennoch kann der Signalverlauf des Ausgangssignals für eine nachgelagerte Signalverarbeitungskette selbst bei Optimalfilterung suboptimal sein. Beispielsweise skaliert das SNR für einen optimal gefilterten Rechteck-Impuls mit der Impulslänge. Für wachsende Impulslängen vergrößert sich somit auch das SNR. Die zeitliche Auflösung verringert sich hingegen zunehmend.

Zum Nachweis von Zellen im Durchfluss ist jedoch sowohl ein hohes SNR als auch eine hohe zeitliche Auflösung erwünscht: Einerseits muss das schwache Fluoreszenzsignal deutlich vom Rauschhintergrund hervorgehoben werden, andererseits soll eine hohe zeitliche Auflösung die Detektion von einzelnen Zellen ermöglichen.

Um beiden Ansprüchen zu genügen, kann eine Strukturierung der Detektionszone vorgenommen werden, sodass eine zeitliche Abfolge vieler kurzer Rechteckimpulse für jede Zelle aufgezeichnet wird. Dadurch wird sowohl eine verhältnismäßig hohe Signalenergie der Messsignale gewährleistet wie auch eine hohe zeitliche Auflösung. Die Rechteckimpulse können, wie in Kap. 2 beschrieben, beispielsweise durch Ausblenden des Fluoreszenzlichtes (Schattenmaske) in gewissen Raumbereichen erzeugt werden.

Während eine Schattenmaske die einfachste Modulationsvariante darstellt, kann für multiple Detektionspfade die gesamte Signalenergie genutzt werden (keine Lichtblockung). Außerdem erlauben multiple Detektionspfade eine wesentlich flexiblere Signalverarbeitung (Kap. 2.4).

Die erhöhte zeitliche Auflösung lässt sich am besten anhand des Frequenzspektrums einer Modulationssequenz bzw. des zugehörigen Optimalfilters erklären (Abb. 3.5 (c)). Die Bandbreite des Spektrums ist definiert als die erste Nullstelle des spektralen Verlaufes für (normierte) Frequenzen mit $\omega > 0$. Bei 4 Abtastungen pro Subpuls entspricht die Bandbreite der gesamten Modulationssequenz gerade derjenigen eines 'moving average'-Filters ($M = 3$) und berechnet sich anhand von Gl. 65 zu $\pi/2$. Der Optimalfilter für binäre Modulationssequenzen kann daher als eine Aneinanderreihung vieler 'moving average' Filter

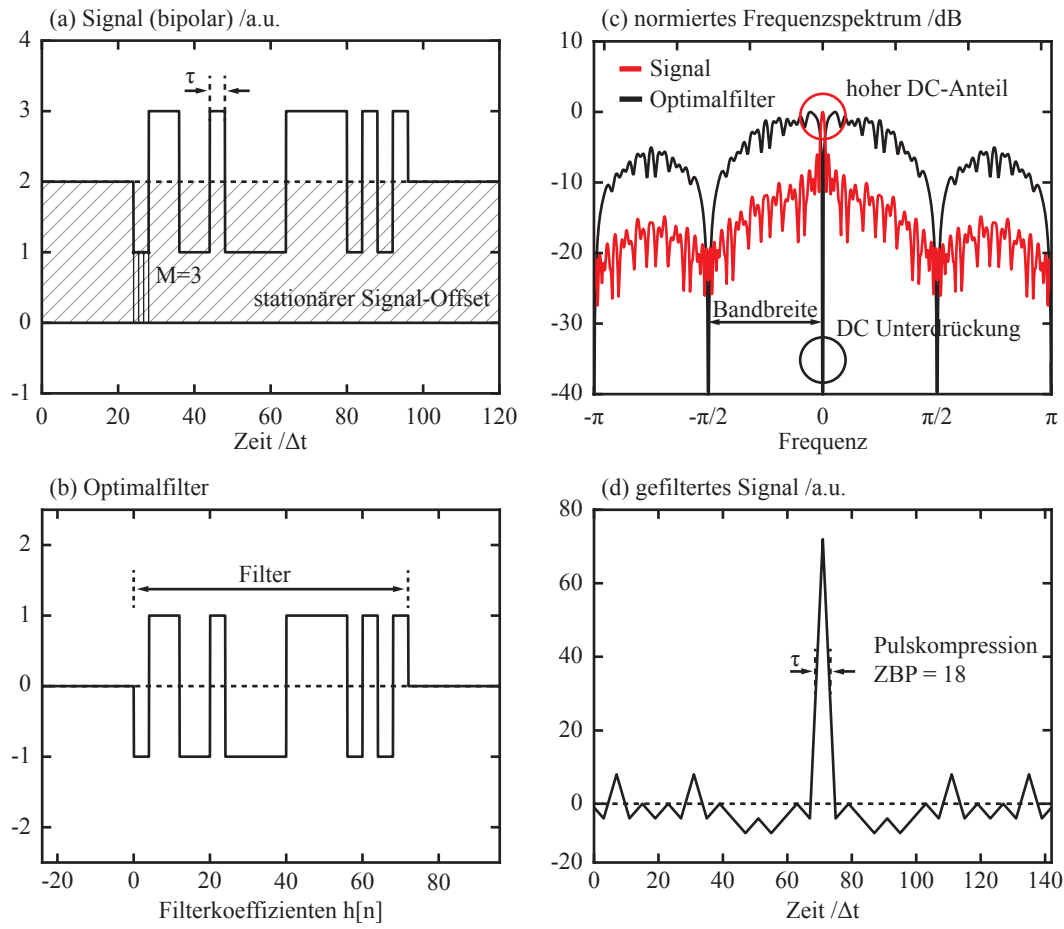


Abb. 3.5: Bipolare Signalsequenz (a) mit Optimalfilter (b). Spektrum- und Übertragungsfunktion des Signals und Filters (c) und Ausgangssignal des Filters (d). In Anlehnung an Abb. 3.2 finden 4 Abtastungen ($M = 3$) pro Subpuls des modulierten Signals statt. Die erste Nullstelle im Spektrum befindet sich bei $\pi/2$ (normierte Frequenz). Das Ausgangssignal des Optimalfilters zeigt einen scharfen Signalpeak mit relativ geringen Signalnebenkeulen. Für dieses Beispiel wird eine Sequenz der Länge $N = 18$, Lfd. Nr. 28 (Anh. A) verwendet.

für entsprechend viele zeitlich skalierte Subpulse verstanden werden. Seine Bandbreite f_B und somit zeitliche Auflösung ist durch die inverse (zeitliche) Länge τ_s des kürzesten Subpulses definiert:

$$f_B = \frac{1}{\tau}. \quad (108)$$

Das sogenannte ‘Zeit-Bandbreiten-Produkt’ ZBP lässt sich zusätzlich als Maß für die Pulskompression definieren. Für einen einzelnen Rechteck-Impuls ist es gegeben durch:

$$ZBP = \tau f_B = \frac{\tau}{\tau} = 1. \quad (109)$$

Dies bedeutet, dass durch Optimalfilterung eines einfachen Rechteckimpulses keinerlei Pulskompression erreicht werden kann [28]. Für eine Puls-Sequenz der Länge N wird die Bandbreite hingegen durch die Einzelimpulsdauer τ_s festgelegt, wodurch sich das ZBP vergrößert:

$$ZBP_N = (N \tau_s) f_{B,s} = N \frac{\tau_s}{\tau_s} = N. \quad (110)$$

Die zeitliche Auflösung eines Modulationssignals hängt somit linear von der Sequenzlänge N ab und wird umso größer, je größer N ist.

3.6 Design von Pulskompressionsfiltern

Im Gegensatz zum SNR hängt der Signalverlauf nach Optimalfilterung maßgeblich vom Verlauf des Eingangssignals ab. Nicht nur die zeitliche Auflösung (Zeit-Bandbreiten-Produkt) wird durch die binäre Modulationssequenz der Länge N beeinflusst. Vielmehr können auch Signalartefakte (Signalnebenkeulen) entstehen, die zu Falscherkennungen führen. Daher sollten nur solche Binärsequenzen S zur Modulation verwendet werden, die bei Optimalfilterung nur bei perfekter Deckungsgleichheit ($r_{SS}[n=0]$) einen hohen Ausschlag aufweisen. Für alle anderen Zeitverschiebungen ($n \neq 0$) sollte der Betrag der Signalamplitude so gering wie möglich sein.

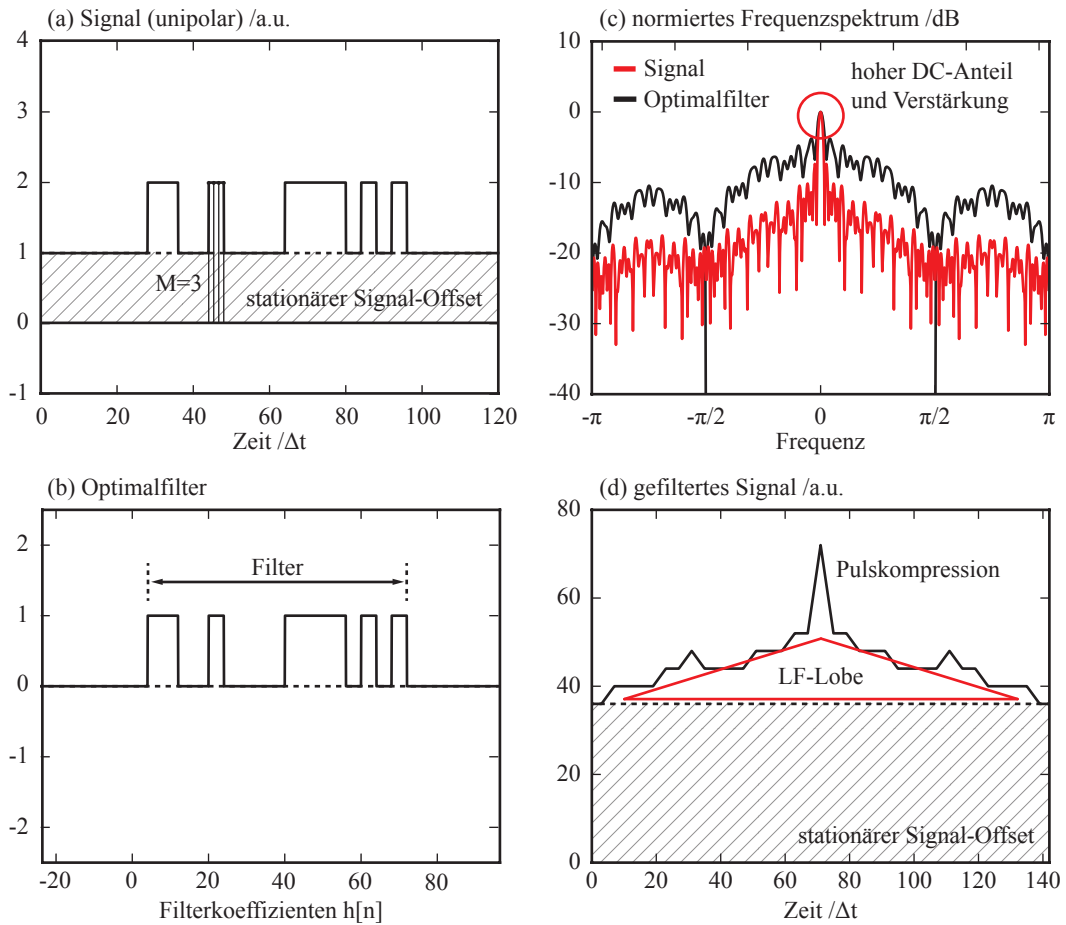


Abb. 3.6: Unipolare Signalsequenz (a) mit Optimalfilter (b). Spektrum- und Übertragungsfunktion des Signals und Filters (c) und Ausgangssignal des Filters (d). In Anlehnung an Abb. 3.2 finden 4 Abtastungen ($M = 3$) pro Subpuls des modulierten Signals statt. Die erste Nullstelle im Spektrum befindet sich bei $\pi/2$ (normierte Frequenz). Das Ausgangssignal des Optimalfilters zeigt einen scharfen Signalpeak mit hohen Signalnebenkeulen und einem stark ausgeprägten dreieckförmigen Verlauf ('LF lobe'). Durch die DC-Verstärkung des Filters weist das Ausgangssignal zudem einen hohen Signaloffset auf. Für dieses Beispiel wird eine unipolare Sequenz der Länge $N = 18$, Lfd. Nr. 28 (Anh. A) verwendet.

Binäre Sequenzen, die gemäß dieser Anforderung eine geringe Selbstähnlichkeit aufweisen, werden als sogenannte 'Low Autocorrelation Binary Sequences' (LABS) bezeichnet. LABS finden weite Anwendung in der Nachrichtentechnik und sind in der Literatur immer in bipolarer Notation aufgeführt und charakterisiert.

Erfolgt die Modulation durch eine Schattenmaske, liegt jedoch eine unipolare Signalsequenz vor. Unipolare Sequenzen können beispielsweise durch Transformation der Koeffizienten einer bipolaren Sequenz gewonnen werden (Tab. 1).

T1:	T2:
$1 \rightarrow 1$	$1 \rightarrow 0$
$-1 \rightarrow 0$	$-1 \rightarrow 1$

Tab. 1: Transformationsvorschriften zur einfachen Gewinnung unipolarer Sequenzen aus bipolaren LABS.

Eine solche Transformation wirkt sich jedoch erheblich auf die Signaleigenschaften nach Optimalfilterung aus (Abb. 3.6 (d)). Während bipolare Sequenzen nur geringe Signalnebenkeulen aufweisen (Abb. 3.5 (d)), zeigen unipolare Sequenzen nach obiger Transformation einen stark ausgeprägten, dreieckförmigen Verlauf ihres Untergrundes ('low frequency (LF) lobe'). Dies ist hauptsächlich dem hohen Gleichanteil ($s_n \geq 0 \forall n$) der unipolaren Modulationssequenz geschuldet. Weiterhin werden durch die hohe DC-Verstärkung des zugehörigen Optimalfilters Signaloffsets des Eingangssignals verstärkt.

Trotz bestmöglichem SNR-Gewinn bei Optimalfilterung, verringert ein solcher Signalverlauf des Ausgangssignals die Entdeckungswahrscheinlichkeit verhältnismäßig schwach fluoreszierender Zellen erheblich, da ein Schwellwert entsprechend hoch gesetzt werden muss (Abb. 3.10 (c)). Außerdem werden schwächere Signale in der Umgebung stärkerer Signale leicht maskiert, sodass der Dynamikbereich (Intensitätsvariation) des Systems stark eingeschränkt wird. Leichte Schwankungen im Untergrund bedingen zusätzlich eine ständige Anpassung des Schwellwerts. Durch einen festen Schwellwert können bestenfalls Intensitätssignale gleicher Größenordnung diskriminiert werden. Daher stellt die Optimalfilterung für unipolare Signalsequenzen keine geeignete Filtermethode dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher alternative Filtertypen entwickelt, mit deren Hilfe eine Pulskompression herbeigeführt werden kann. Dabei handelt es sich um angepasste Bandpass-Filter, die vor allem die DC-Komponenten und niedere Frequenzanteile der Eingangssignale unterdrücken, um die Entstehung von ausgeprägten Trendverläufen des Signaluntergrundes zu unterbinden. Da ein Großteil der Signalenergie jedoch durch niedere Frequenzanteile gegeben ist, geht die Verwendung solcher Filtertypen immer zu Lasten der maximalen Ausgangsamplitude und damit zu Lasten des SNR.

Weiterhin erfordern diese Filter unterschiedliche Software- bzw. Hardware-Ressourcen bei der Signalverarbeitung, sodass immer eine Kosten-Nutzen-Abwägung zwischen SNR-Gewinn, Systemdynamik, Rechenzeit und Realisierungskosten getroffen werden muss.

Neben angepassten Pulskompressionsfiltern können bipolare Sequenzen auch geschickt transformiert werden, um nebenkeulenreduzierte oder gar nebenkeulenfreie Signale zu erhalten (Kap. 3.8). Das Prinzip des 'On-Off-Keying' (OOK), das in der RADAR Technik auch zur sogenannten 'nichtkohärenten Pulskompression' (engl. non-coherent pulse compression, NCPC) [33–35] genutzt wird, beruht auf der Manchester-Transformation bipolarer Signalsequenzen. Diese Transformation erlaubt es, Signaleigenschaften von bipolaren Signalsequenzen teilweise auf unipolare Signale zu übertragen. Außerdem weisen Manchester-transformierte Sequenzen immer balancierte Filterkoeffizienten auf, sodass Gleichanteile im Signal vollständig unterdrückt werden ($A_{DC} = 0$).

Eine weitere Signalklasse sind die sogenannten Komplementären Codes [32, 36–38], die immer paarweise (S_1, S_2) zur Modulation verwendet werden (Kap. 3.9). Die besondere Eigenschaft dieser Sequenzen liegt darin, dass die Autokorrelationsfunktion von S_1 und S_2 zueinander inverse Signalnebenkeulen aufweisen. Die Addition beider Autokorrelationsfunktionen resultiert daher in einem nebenkeulenfreien Signal. Durch Manchester-Transformation können die Signaleigenschaften bipolarer Komplementärer Codes ebenfalls auf unipolare Signale ausgedehnt werden [39]. Trotz bestmöglicher Signaleigenschaf-

ten, besitzen Komplementäre Codes (bipolar und unipolar) den Nachteil, dass sie nur für Apparaturen mit multiplen Detektionskanälen genutzt werden können.

Alle Pulskompressionsfilter, die in dieser Arbeit diskutiert werden, werden anhand verschiedener Signaleigenschaften charakterisiert. Dabei handelt es sich um das sogenannte ‘Peak-to-sidelobe-ratio’ (PSLR), das ‘Integrated-sidelobe-ratio’ (ISLR) und der DC-Verstärkung A_{DC} , die idealerweise Null ist.

PSLR und ISLR sind wie folgt definiert [31]:

$$PSLR := \frac{1}{R_{HS}[0]^2} \left(\max_{n \neq 0} |R_{HS}[n]| \right)^2 \quad (111)$$

$$ISLR := \frac{1}{R_{HS}[0]^2} \sum_{n \neq 0} R_{HS}^2[n] \quad (112)$$

S bezeichnet dabei eine binäre Modulationssequenz, H einen entsprechenden Pulskompressionsfilter, $R_{HS}[n]$ die Kreuzkorrelation zwischen H und S (Gl. 107) und $R_{HS}[0] = E$ die Signalenergie. Das PSLR ist ein Maß für das Verhältnis aus der höchsten Signalnebenkeule und dem eigentlichen Signalpeak. Das ISLR hingegen ist ein Maß für das Verhältnis aus der Summe aller Signalnebenkeulen und dem eigentlichen Signalpeak. Im Gegensatz zum PSLR beschreibt das ISLR die ‘Homogenität’ des gesamten Signalverlaufs. Zur Berechnung beider Werte erfolgt zunächst eine Quadrierung aller Signalkomponenten, um unabhängig vom Vorzeichen einzelner Signalkomponenten zu sein.

Zusammenfassend sollte ein Pulskompressionsfilter so beschaffen sein, dass das Ausgangssignal (bei bekanntem Signalverlauf des Eingangssignals) folgende Eigenschaften aufweist:

- Keine DC-Verstärkung
- geringes PSLR und ISLR
- hoher SNR-Gewinn

Die in folgenden Abschnitten beschriebenen Pulskompressionsfilter, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden, werden anhand dieser Zielsetzungen diskutiert.

3.6.1 Flankenfilter

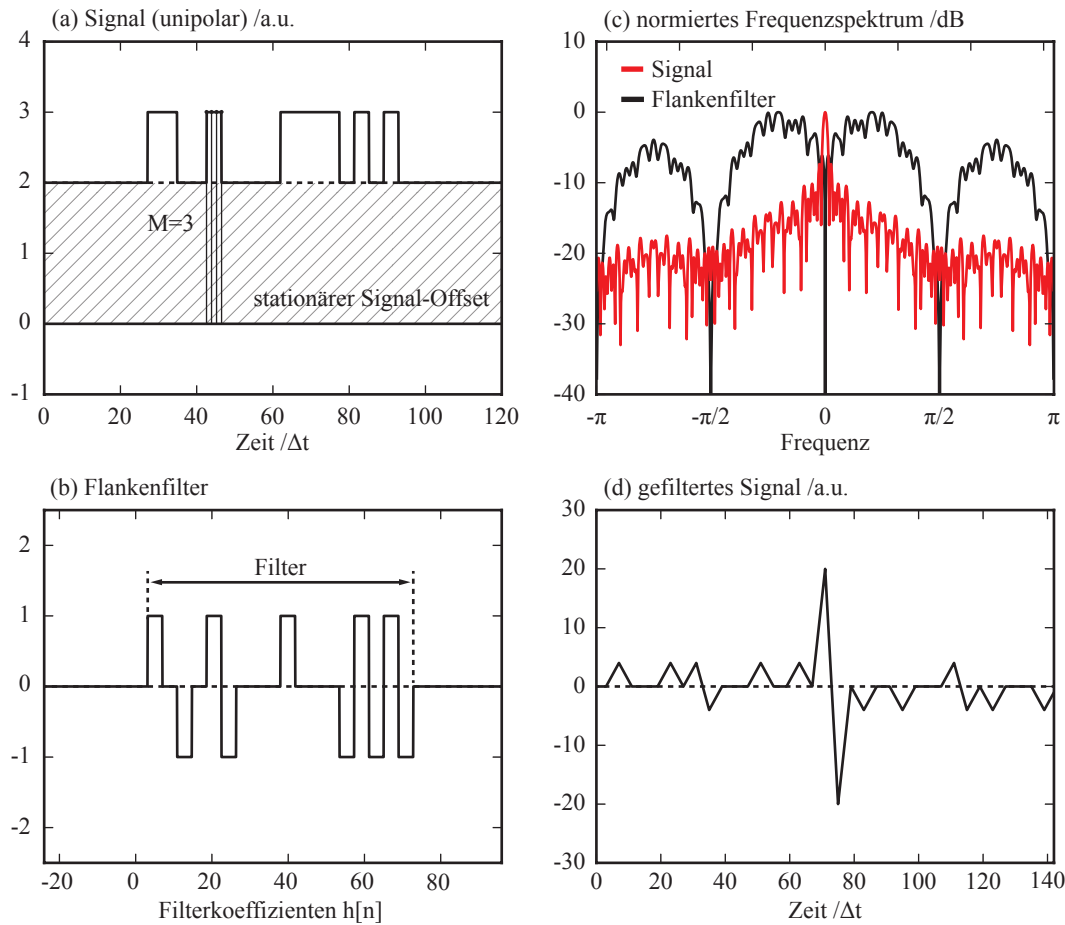


Abb. 3.7: Signalsequenz (a), Flankenfilter (b). Spektrum- und Übertragungsfunktion des Signals und Filters (c) und Ausgangssignal (d). Im direkten Vergleich von Signal und Filter lässt sich erkennen, dass das Flankenfilter vor allem sensitiv auf die Flanken des Signals ist. Die Normierungskonstante C_F (siehe Text) ist in diesem Beispiel zu 1 gesetzt. In Anlehnung an Abb. 3.2 finden 4 Abtastungen ($M = 3$) pro Subpuls des Signals statt. Die erste Nullstelle im Spektrum befindet sich daher bei $\pi/2$ (normierte Frequenz), siehe (c). Das symmetrische Ausgangssignal des Flankenfilters zeigt signifikante Signalnebenkeulen (d). Für dieses Beispiel wird eine Sequenz der Länge $N = 18$, Lfd. Nr. 28 (Anh. A) verwendet.

Das Flankenfilter ist der erste Filtertyp, der für das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz verwendet wurde [13, 14]. Ursprünglich wurde das unipolare Fluoreszenzsignal zunächst einer Optimalfilterung unterzogen, um eine Pulskompression zu erreichen. Die Eliminierung des Signaloffsets und der 'LF-Lobe' erfolgte dann durch eine Differenzierung, d.h. Korrelation des Signalverlaufs mit dem Filterkern $DIFF = [-1, 1]$ in einem zweiten Schritt.

Die Schritte der Optimalfilterung und Differenzierung lassen sich in einem gemeinsamen Schritt zusammenfassen, um Rechen- und Speicherbedarf der digitalen Signalverarbeitung zu verringern:

$$DIFF \otimes (S \otimes S) = - \underbrace{(DIFF \otimes S)}_{C_F^{-1} H_F} \otimes S. \quad (113)$$

Dies geschieht in Anlehnung an Gl. 38, wobei die Kreuzkorrelation das Assoziativgesetz im Gegensatz zur Faltung und Autokorrelation nicht erfüllt. Daher kommt ein zusätzliches Vorzeichen ins Spiel, dem durch entsprechende Normierung begegnet werden kann.

Das Flankenfilter ist somit gegeben durch:

$$H_F = -C_F (DIFF \otimes S). \quad (114)$$

C_F übernimmt die Rolle des Normierungsfaktors und $h_F[n] \in \{-C_F, 0, C_F\}$.

Durch den Differenzierungsschritt ist das resultierende Filter H_F mit Filterkoeffizienten h_F besonders sensitiv auf Flankenänderungen des Signals. Dies lässt sich bei direktem Vergleich von Signalverlauf und Filterkoeffizienten (Abb. 3.7 (a),(b)) erkennen. Bereiche mit konstanter Signalamplitude bleiben vom Filter weitestgehend unbeachtet (mit Nullen multipliziert) und tragen nicht zur Ausgangsamplitude bei. Ohne weitere Charakterisierungen vorzunehmen, lässt sich vermuten, dass der maximale SNR-Gewinn dieses Filters dadurch verhältnismäßig gering sein muss.

Da es sich bei $DIFF = [-1, 1]$ um einen balancierten Filterkern handelt, sind auch die Filterkoeffizienten h_F automatisch balanciert, d.h. alle auftretenden DC-Komponenten des Eingangssignals werden geblockt (Abb. 3.7 (c)). Als weitere Eigenschaft zeigt das Flankenfilter einen punktsymmetrischen Signalverlauf seines Ausgangssignals (Abb. 3.7 d)) mit signifikanten Signalnebenkeulen.

Der Nachteil eines vermeintlich geringen SNR-Gewinns und die hohen Signalnebenkeulen des Flankenfilters überwiegen deutlich die Vorteile einer einfachen Konstruktionsweise und der automatischen Balancierung, sodass das Filter für die spätere Verwendung eher ungeeignet ist.

3.6.2 Balanciertes Filter

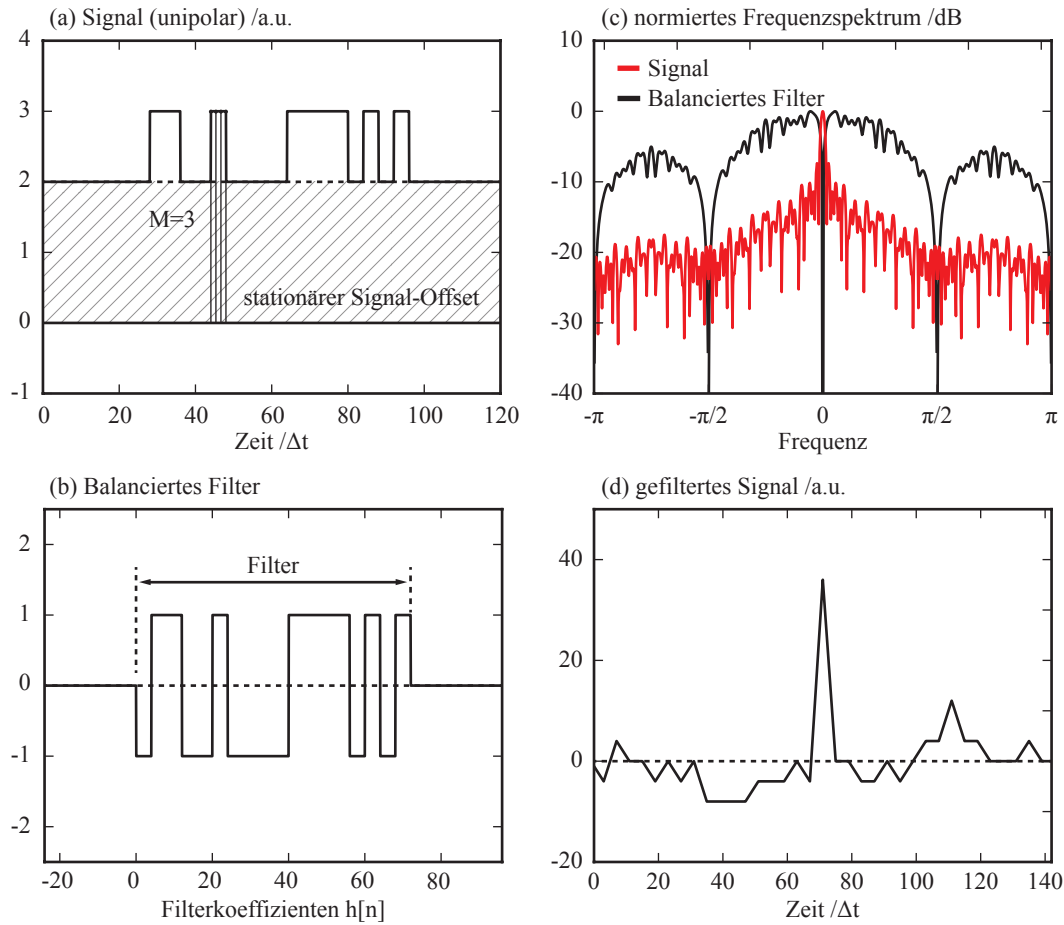


Abb. 3.8: Signalsequenz (a), Balanciertes Filter (b). Spektrum- und Übertragungsfunktion des Signals und Filters (c) und Ausgangssignal (d). Das Balancierte Filter berücksichtigt sämtliche Anteile des unipolaren Nutzsignals. Für die DC-Unterdrückung werden jedoch auch solche Signalanteile berücksichtigt, die nur Rauschen und Signaloffset enthalten. Verglichen mit dem Optimalfilter führt dies zu einem verringerten SNR-Gewinn. Der Normierungsfaktor C_B ist in diesem Beispiel zu 2 gesetzt. In Anlehnung an Abb. 3.2 finden 4 Abtastungen ($M = 3$) pro Subpuls des Signals statt. Die erste Nullstelle im Spektrum befindet sich daher bei $\pi/2$ (normierte Frequenz), siehe (c). Das Ausgangssignal des Balancierten Filters zeigt je nach verwendeter Sequenz starke Über- und Unterschwinger um die Peakposition (d). Diese werden maßgeblich von den Strukturbreiten und deren Verteilung innerhalb der Sequenz beeinflusst. Für dieses Beispiel wird eine Sequenz der Länge $N = 18$, Lfd. Nr. 28 (Anh. A) verwendet.

Neben dem Flankenfilter kann das Balancierte Filter ebenfalls per Konstruktionsvorschrift aus einer unipolaren Sequenz erzeugt werden. Dazu wird der Mittelwert der gesamten Sequenz von allen Sequenzkoeffizienten subtrahiert, sodass sie in der Summe Null ergeben ($A_{DC} = 0$):

$$H_B = C_B \left(s - \frac{1}{2} \bar{s} \right) \quad (115)$$

C_B ist dabei der Normierungsfaktor des Balancierten Filters. Die Filterkoeffizienten h_B des Balancierten Filters H_B können die Werte a und b annehmen und sind gegeben durch:

$$a = C_B \left(1 - \frac{1}{2} \bar{S} \right) \quad (116)$$

$$b = C_B \left(0 - \frac{1}{2} \bar{S} \right). \quad (117)$$

Anhand von Abb. 3.8 (a) und (b) kann man erkennen, dass das Filter im Gegensatz zum Flankenfilter alle Signalanteile des Eingangssignals berücksichtigt. Um einen stationären Signaloffset zu eliminieren ($A_{DC} = 0$), werden jedoch auch solche Signalanteile in das Ausgangssignal einbezogen, die nur Rauschen und Signaloffset enthalten. Dadurch wird der SNR-Gewinn ebenfalls verringert und reicht nicht an den des Optimalfilters heran.

Die Ausgangssignale des Balancierten Filters können sich abhängig von der verwendeten Sequenz stark unterscheiden. Der Hauptpeak befindet sich oftmals in der Mitte eines asymmetrischen Signalverlaufs (Abb. 3.8 (d)), der starke Über- oder Unterschwinger um die Mittellage verzeichnet. Dies ist auf die inhomogene Gestalt vieler Sequenzen zurückzuführen, die viele Strukturen unterschiedlicher Breiten aufweisen. Eine inhomogene Verteilung dieser Strukturen innerhalb der Gesamtsequenz, kann den Effekt eines stark schwankenden Untergrunds und das Auftreten störender Signalnebenkeulen verstärken.

Bezogen auf die spätere Anwendung bietet das Balancierte Filter einen verhältnismäßig hohen SNR-Gewinn, ist einfach zu konstruieren und zu implementieren und kann, je nach verwendeter Sequenz, gute Ausgangssignale erzielen. Gerade Manchester-transformierte Sequenzen (Kap. 3.8) können ausschließlich mit dem Balancierten Filter verwendet werden.

3.6.3 Nebenkeulenoptimiertes Filter

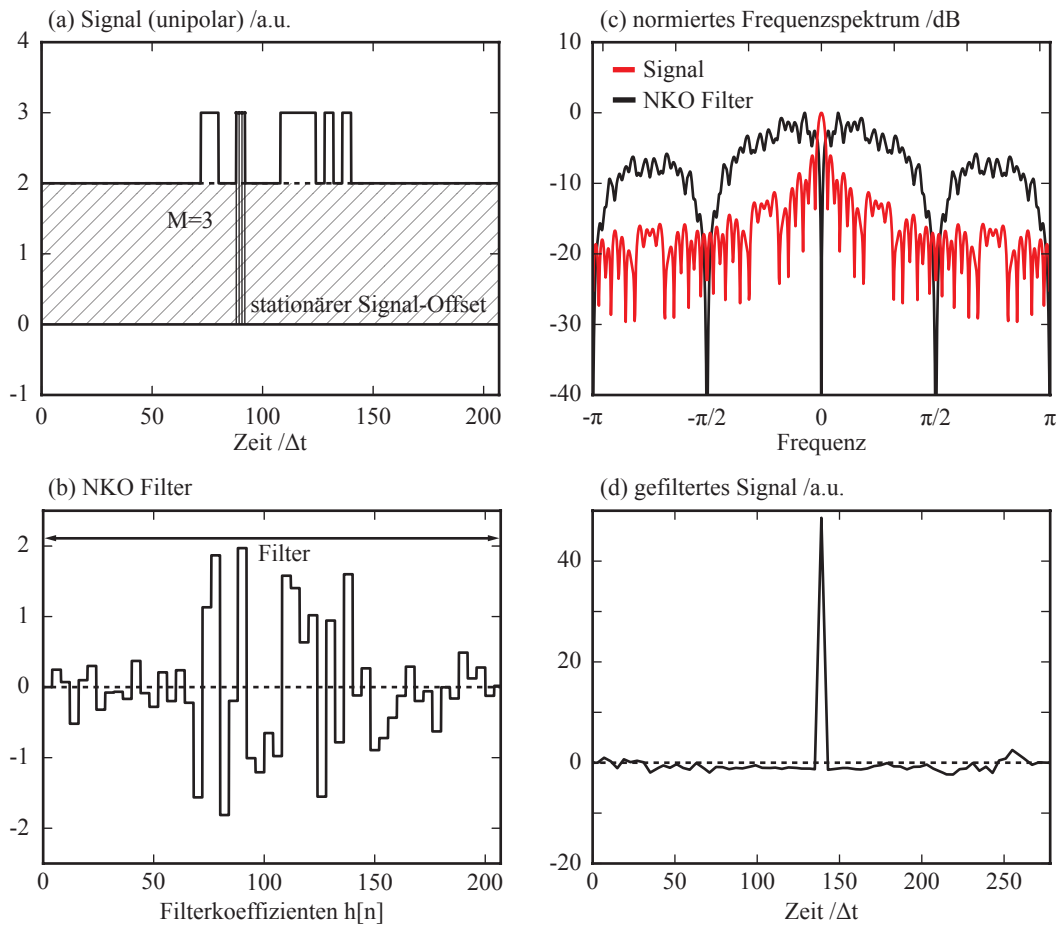


Abb. 3.9: Signalsequenz (a), NKO Filter (b). Spektrum- und Übertragungsfunktion des Signals und Filters (c) und Ausgangssignal (d). Das NKO Filter berücksichtigt sämtliche Anteile des unipolaren Nutzsignals. Darüber hinaus werden auch solche Signalanteile berücksichtigt, die für die DC-Unterdrückung wichtig sind und nur Rauschen und Signalsoffset enthalten. Das Filter besitzt für dieses Beispiel die dreifache Länge ($3N$) der eigentlichen Sequenz, um Signalnebenkeulen aktiv zu unterdrücken. Verglichen mit dem Optimalfilter führt dies zu einem verringerten SNR-Gewinn. Der Normierungsfaktor C_{NKO} ist in diesem Beispiel zu 1 gesetzt, die Filterkoeffizienten bewegen sich im Intervall $[-2,2]$. In Anlehnung an Abb. 3.2 finden 4 Abtastungen ($M = 3$) pro Subpuls des Signals statt. Die erste Nullstelle im Spektrum befindet sich daher bei $\pi/2$ (normierte Frequenz), siehe (c). Das Ausgangssignal des NKO Filters zeigt ein flaches und homogenes Signal um die Peakposition (d). Für dieses Beispiel wird eine Sequenz der Länge $N = 18$, Lfd. Nr. 28 (Anh. A) verwendet.

Die Konstruktion des Nebenkeulenoptimierten (NKO) Filters ist mit deutlich höherem Aufwand verbunden, als alle bislang vorgestellten Filtertypen, die sich über einfache Transformationsvorschriften generieren lassen. NKO Filter haben zum Ziel, Signalnebenkeulen, die beim Korrelationsprozess entstehen, weitestgehend zu unterdrücken. Da Nebenkeulen immer beim Ein- und Auslaufvorgang eines Signals auftreten, sind NKO Filter typischerweise länger (Längen $2N$ oder $3N$) als die eigentliche Sequenz (N), um dabei entstehenden Signalartefakten entgegenzuwirken (Abb. 3.9 (b)). Die Konstruktion von NKO Filter reicht bis in die Anfänge der RADAR-Technik zurück, da die Dynamik erhöht und die Falscherkennungsrate von RADAR-Systemen durch solche Filter drastisch reduziert werden kann.

Für einfache Modulationssequenzen mit hochsymmetrischen Korrelationssignalen kann die Filteroptimierung mit einfachen linearen Optimierungsalgorithmen (sog. LP Algorithmen) erfolgen [40–45]. Dies

betrifft vor allem die sogenannte Klasse der Barker-Codes [46]. Für längere Sequenzen können analytische Ansätze jedoch nicht mehr angewandt werden, so dass es anderer Optimierungsstrategien bedarf. Als besonders effektiv hat sich die Methode der ‘differential evolution’ (DE) nach Storn und Price erwiesen [47], die im Software-Toolkit von NI Labview als globale Optimierungsroutine zur Verfügung steht. Folgende Notationen und Erklärungen zu dieser Optimierungsstrategie orientieren sich stark an [47].

Die wichtigste Voraussetzung für eine globale Optimierung ist die Definition der sogenannten Zielfunktion (‘objective function’, ‘cost function’, ‘energy function’, usw.), die es in der Regel zu minimieren gilt. In dieser Zielfunktion können nicht nur die eigentlichen Optimierungsziele, sondern auch Randbedingungen bzw. Zwangsbedingungen (‘constraints’) formuliert werden, die beim Optimierungsprozess berücksichtigt werden. Sowohl die Optimierungsziele (Anzahl: P) als auch die Zwangsbedingungen (Anzahl: C) können als gemeinsamer Parametersatz g_m des Systems mit

$$m \in \left\{ \underbrace{0, 1, 2, \dots, P-1}_{\text{‘objectives’}}, \underbrace{P, P+1, \dots, P+C-1}_{\text{‘constraints’}} \right\}. \quad (118)$$

aufgefasst werden. Die Systemgrößen (Anzahl: D), die der eigentlichen Optimierung unterliegen, werden als q_j mit

$$j \in \{0, 1, 2, \dots, D-1\}. \quad (119)$$

bezeichnet. Bei der Optimierung lässt sich jeder Systemparameter g_m als Funktion f_m der Systemgrößen q_j formulieren:

$$g_m = f_m(q_j). \quad (120)$$

Die Systemgrößen q_j bewegen sich meist in fest definierten Grenzen (‘bounds’), die nicht überschritten (‘upper bound’, q_{ju}), bzw. unterschritten (‘lower bound’, q_{jl}) werden dürfen:

$$q_j \in [q_{jl}, q_{ju}]. \quad (121)$$

Diese Randbedingungen können ebenfalls als Zwangsbedingung formuliert und g_m hinzugefügt werden. Da verschiedene Optimierungsziele wie auch Zwangsbedingungen von unterschiedlicher Bedeutung sein können, bietet es sich an, zusätzliche Gewichtungsparmater w_m einzuführen. Diese erlauben es, alle f_m zu einer einzigen Zielfunktion $H(x_j)$ zu kombinieren, die es dann zu minimieren gilt:

$$H(q_j) = \sum_{m=0}^{P+C-1} w_m f_m(q_j) \longrightarrow \min H(x_j). \quad (122)$$

Da im Allgemeinen $q_j \in \mathbb{R}$ gilt, kann die Optimierung als Abbildung aus einem D -dimensionalen Raum, in einen eindimensionalen Raum aufgefasst werden:

$$H : \mathbb{R}^D \longrightarrow \mathbb{R}. \quad (123)$$

Der eigentliche Ablauf der Optimierung umfasst viele sequentielle Schritte und wird entweder durch zufällige oder festgelegte Startwerte eingeleitet. Die Optimierungsroutine lässt sich ihrerseits durch weitere Optimierungsparameter beeinflussen, sodass der Algorithmus, je nach Optimierungsziel, schneller zur Konvergenz gebracht werden kann. Auf die genaue Beschreibung des Ablaufs und die Einzelheiten der Optimierung wird an dieser Stelle jedoch verzichtet und auf [47] verwiesen.

Für die Filtergenerierung eines NKO Filters mit NI Labview (Anh. B) müssen zunächst die Optimierungsziele festgelegt werden. Dabei haben sich das ISLR (Gl. 112) und PSLR (Gl. 111) als geeignete Zielfunktionen erwiesen, da beide ein Maß für auftretende Signalnebenkeulen sind und nicht vom Vorzeichen der Signale abhängen.

In einem zweiten Schritt wird eine Modulationssequenz S der Länge N gewählt, für die das NKO Filter generiert werden soll. Die Länge des Filters misst sich dabei an der Länge der Modulationssequenz und beträgt typischerweise $3N$ (s.o.). Für die Optimierung wird die Sequenz S mit einer Sequenz Z von Nullen am rechten und am linken Rand zur Sequenz S_0 erweitert:

$$S_0 = \{ZSZ\}. \quad (124)$$

Z besitzt dabei ebenfalls die Länge N . Mit der Erweiterung von S zu S_0 wird gewährleistet, dass der Hauptpeak im Ausgangssignal genau dann auftritt, wenn S_0 vollständig in das NKO Filter eingelaufen ist. Dabei befindet sich S zentriert im Filter. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die Signalnebenkeulen sowohl beim Einlaufen in das Filter, als auch beim Auslaufen gleichermaßen unterdrückt werden [31].

Die unbekannten Filterkoeffizienten $h_{\text{NKO}}[n]$ entsprechen den Systemgrößen q_j der Optimierung und legen durch ihre Anzahl die Dimension des Suchraums fest (z.B. $D = 3N$).

Da balancierte Filterkoeffizienten ($A_{\text{DC}} = 0$) eine wichtige Voraussetzung sind, kann dies als Zwangsbedingung definiert werden. Dazu bieten sich die sogenannten (optionalen) ‘equality constraints’ an, die in der ‘objective and constraint function’ der ‘global optimization’ Routine festgelegt werden können. Für die ‘equality constraints’ $g_e(x_j) \subset g_m(x_j)$ gilt:

$$g_e(q_j) = \sum_j q_j = \sum_n h[n] = 0. \quad (125)$$

Zusätzlich werden obere und untere Grenzen für die Filterkoeffizienten $h_{\text{NKO}}[n]$ des NKO Filters mit $q_j \in \{-1, 1\}$ als Zwangsbedingung festgelegt.

Die Optimierung umfasst eine vorher festgelegte maximale Zahl an Iterationen. Wird dieses Maximum erreicht, so bricht die Routine ab. Es besteht jedoch keine Garantie dafür, dass das globale Minimum, d.h. das Optimum im Suchraum, auch tatsächlich getroffen wird. Denn eine Konvergenz gegen lokale Minima kann nicht ausgeschlossen werden.

In Abb. 3.9 (b) sind beispielhaft die Filterkoeffizienten eines NKO Filters der Länge $3N$ dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Filterkoeffizienten im mittleren Teil eine starke Ähnlichkeit zur Modulationssequenz, bzw. zum Balancierten Filter aufweisen (3.8 (b)). Die Abweichungen des NKO Filters vom Balancierten Filter und die Beiträge außerhalb des Mittelbereichs sind der Nebenkeulenunterdrückung geschuldet.

Obwohl das NKO Filter eine sehr gute Signaldynamik mit nur sehr geringen Nebenkeulen aufweist (3.9 (d)), lässt sich vermuten, dass das NKO Filter einen schlechteren SNR-Gewinn als das Balancierte Filter erzielt. Dies liegt darin begründet, dass bei Deckungsgleichheit von Signal und Filter auch solche Signalanteile zum Ausgangssignal beitragen, die nur Rauschen enthalten.

Neben einem vermeintlich schlechteren SNR-Gewinn verglichen zum Balancierte Filter, bedingt das NKO Filter durch seine Länge eine höhere Signallaufzeit und Speicherbedarf. Auch die gebrochenrationalen Filterkoeffizienten können einen höheren Speicherbedarf bedeuten.

Für die spätere Anwendung hat sich gezeigt, dass das NKO Filter bei hohen Zelldichten und engen Geschwindigkeitsverteilungen (Kap. 4) eine bessere Signaldynamik als das Balancierte Filter zeigt. Je nach Anwendungsfall und Ressourcen stellt das NKO Filter eine wesentlich bessere Alternative zum Balancierten Filter dar.

3.7 Vergleich der Pulscompressionsfilter

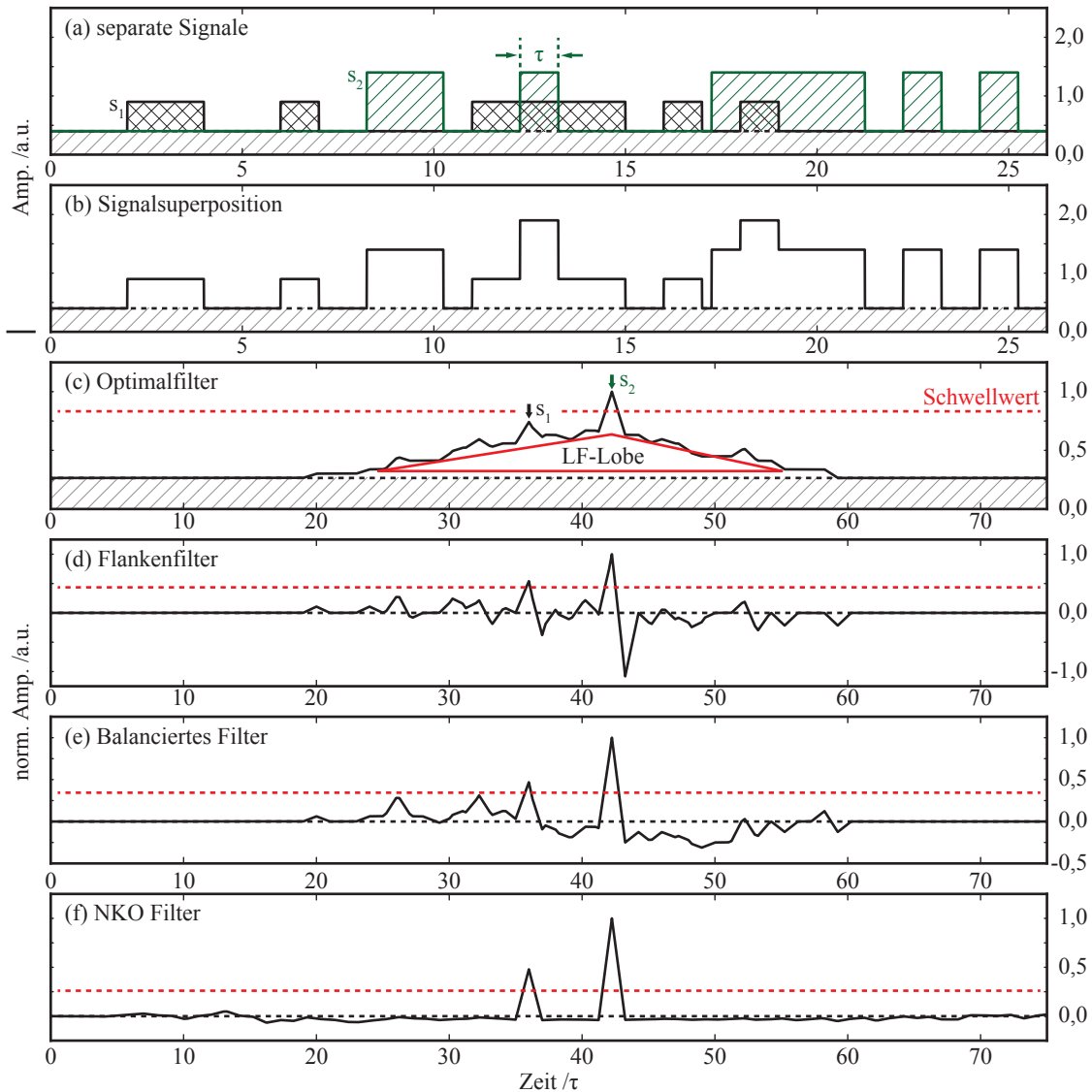


Abb. 3.10: Filterdynamik bei Signalsuperposition von zwei Einzelsignalen mit Amplituden 0,5 (s_1) und 1 (s_2). Gezeigt sind die Einzelsignale (a), ihre Superposition (b) und die Filterergebnisse des Optimalfilters (c), des Flankenfilters (d), des Balancierten Filters (e) und des NKO Filters (f). Die Festlegung eines Schwellwertes macht deutlich, dass das Optimalfilter, das Flankenfilter und das Balancierte Filter zu einer eingeschränkten Signaldynamik führen, woraus Falscherkennungen resultieren können. Lediglich das NKO Filter besitzt eine für dieses Beispiel ausreichende Dynamik. Die verwendete Sequenz besitzt die Länge $N = 18$ (Lfd. Nr. 28, Anh. A).

Bei der Signalverarbeitung unipolarer Modulationssequenzen, die gemäß der Transformationsvorschrift in Tab. 1 aus bipolaren Sequenzen gewonnen werden, treten mitunter viele und starke Signalnebenkeulen. Dies ist in der inhomogenen Verteilung entstehender Strukturbreiten begründet.

Wegen des hohen DC-Anteils der Signale und der DC-Verstärkung des Filters, scheidet die Optimalfilterung als Signalverarbeitungsschritt aus. Die Systemdynamik wäre aufgrund des dreieckförmigen Verlaufs des Ausgangssignals und des hohen Signaloffsets zu stark eingeschränkt. Daher wurden im letzten Abschnitt andere Pulscompressionsfilter vorgestellt, die die Signalcharakteristik zwar verbessern, verglichen mit dem Optimalfilter aber mit SNR-Verlust einhergehen. Auch die Qualität der Ausgangssi-

gnale (Signalnebenkeulen) kann je nach Sequenz und Filter stark variieren. Besonders deutlich werden diese Unterschiede wenn sich mehrere Zellen mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität (Dynamik) gleichzeitig im Detektionsbereich befinden (Abb. 3.10).

Für die Ausgangssignale (d) und (e) in Abb. 3.10 wird beispielsweise ein Schwellwert gewählt, der es gerade noch erlaubt, den schwächeren Signalpeak zu detektieren. In Abhängigkeit des Filtertyps kann dieser Schwellwert unter gewissen Umständen bereits sehr nah an der höchsten Signalnebenkeule liegen. Vor allem bei Signalsuperpositionen mehrerer Zellen, können sich Signalnebenkeulen von Einzelsignalen überlagern und hohe Amplitudenwerte erreichen. Dies ist vor allem für das Flankenfilter (d) und das Balancierte Filter (e) zu beobachten.

Je größer der Dynamikbereich ist, desto niedriger muss ein Schwellwert gesetzt werden. Bei schlecht gewählter Kombination aus Sequenz und Filter kann dies zu vielen Falscherkennungen führen. Lediglich das NKO Filter (f) bildet eine Ausnahme. Seine Generierung und Implementierung bedeuten jedoch den höchsten Ressourcen- und Rechenaufwand und es führt zu einem geringeren SNR-Gewinn als das Balancierte Filter.

3.8 Manchester Transformation

Die Generierung unipolarer Modulationssequenzen aus bipolaren LABS gemäß Tab. 1 stellt eine einfache Variante einer Transformation dar. Sowohl die Originalsequenz als auch die resultierende unipolare Sequenz können eine stark inhomogene Verteilung ihrer Strukturbreiten, bezogen auf die Gesamtsequenz, aufweisen. Diese inhomogene Verteilung kann starke Signalnebenkeulen und Fluktuationen des Signaluntergrunds nach einer Pulskompression zur Folge haben (vgl. Abb. 3.8).

	M1:	M2:
Signal:	1 \rightarrow 10 -1 \rightarrow 01	1 \rightarrow 01 -1 \rightarrow 10
Filter:	1 \rightarrow 1 - 1 -1 \rightarrow -11	1 \rightarrow -11 -1 \rightarrow 1 - 1

Tab. 2: Manchester-Transformation von bipolaren LABS in unipolare Sequenzen.

Das sogenannte On-Off-Keying (OOK) bietet sich alternativ als geeignetere Transformationsvariante an. OOK basiert auf der Manchester-Transformation einer bipolaren Modulationssequenz und wird beispielsweise für RADAR-Anwendungen mit Lasern (LIDAR) verwendet [35]. Die Transformationsvorschriften, die sich nach dieser Methode für bipolare Codes ergeben, sind in Tab. 2 aufgeführt.

Bei dieser Transformation wird sowohl eine neue Sequenz als auch ein entsprechendes Filter erzeugt. Das Filter hat die Eigenschaft, dass es genauso viele Nullen wie Einsen besitzt und somit automatisch balanciert ist. Mit anderen Worten wird sowohl eine neue Sequenz als auch das entsprechende Balancierte Filter generiert. Die Länge N der Ausgangssequenz und des zugehörigen Filters werden dabei verdoppelt.

Es kann nachgewiesen werden, dass die Signaleigenschaften bipolarer LABS nach Manchester-Transformation im positiven Signalbereich der Ausgangssignale teilweise erhalten bleiben [34]. Besitzt das Autokorrelationssignal eines bipolaren LABS beispielsweise eine maximale Nebenkeulenamplitude von 1 (in der positiven Halbebene), so würde auch das Ausgangssignal nach Manchester-Transformation eine maximale Nebenkeulenamplitude von 1 besitzen. Dies gilt jedoch nicht für Nebenkeulen mit negativer Amplitude.

Manchester-transformierte LABS haben den Vorteil, dass nur Strukturbreiten der Längen 1 und 2 auftreten, die zudem homogen über die Gesamtsequenz verteilt sind. Das Korrelationssignal, das sich aus

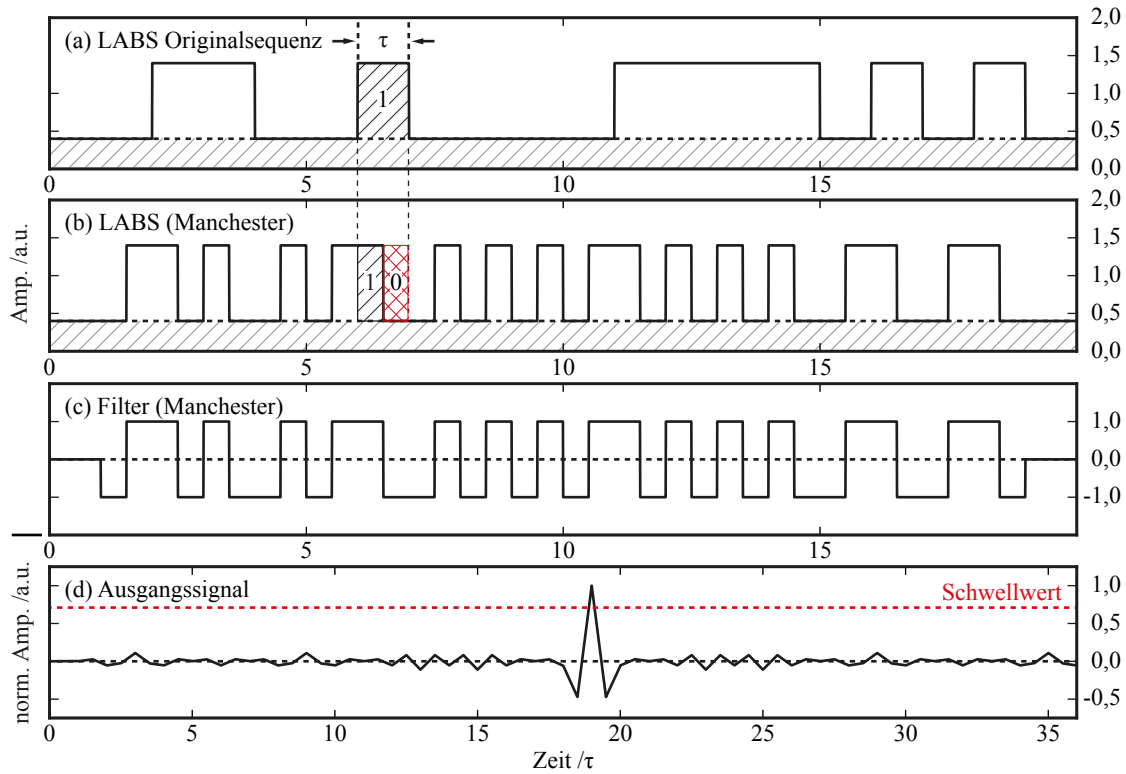


Abb. 3.11: Unipolare Originalsequenz nach T1-Transformation (Tab. 1) (a) und Manchester-M1-Transformation (b). Zum direkten Vergleich der Signale ist die Sequenz in (a) zeitlich um das Doppelte gestreckt. Die Korrelation des Manchester-transformierten Signals mit dem Manchester-transformierten Filter (c) resultiert in einem homogenen Ausgangssignal (d) mit charakteristischen Unterschwingern um die Peak-Position. Die Amplitude der höchsten (positiven) Signalnebenkeule in (d) entspricht derjenigen, die sich auch für die entsprechende bipolare Originalsequenz ergibt.

Sequenz und Filter ergibt, weist dagegen über seine gesamte Länge nur geringe Signalnebenkeulen auf. Einzige Ausnahme bilden zwei stark ausgeprägte Unterschwinger, die unmittelbar vor und nach dem Hauptpeak auftreten. Diese Unterschwinger sind bei jeder Sequenz zu beobachten und für Manchester transformierte Sequenzen charakteristisch.

Die Signalnebenkeulen im Ausgangssignal lassen sich weiter reduzieren, indem die Manchester Enkodierung in Verbindung mit entsprechenden NKO Filtern genutzt wird. Gemäß Abb. 3.12 wird das NKO Filter zu diesem Zweck zunächst für die bipolare Originalsequenz mit gewünschter Länge (z.B. $3N$) generiert. Dann wird das NKO Filter einer Manchester-Transformation analog zur Modulationssequenz unterzogen. Für die Manchester Transformationen M1 und M2 (Tab. 2) würden die Filterkoeffizienten h_n des NKO Filters gemäß

$$h_n \longrightarrow -h_n + h_n \quad \text{bzw.} \quad h_n \longrightarrow +h_n - h_n \quad (126)$$

transformiert. Entsprechend der Länge des NKO Filters können Manchester transformierte NKO Filter die sechsfache Länge der bipolaren Originalsequenz besitzen.

Die Manchester-Transformation von LABS vereinfacht die Signalverarbeitung unipolarer Modulationssignale erheblich und spielt daher eine Schlüsselrolle für das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz. Dank dieser Transformation können bipolare LABS mit geringen Signalnebenkeulen sofort für das Prinzip genutzt werden.

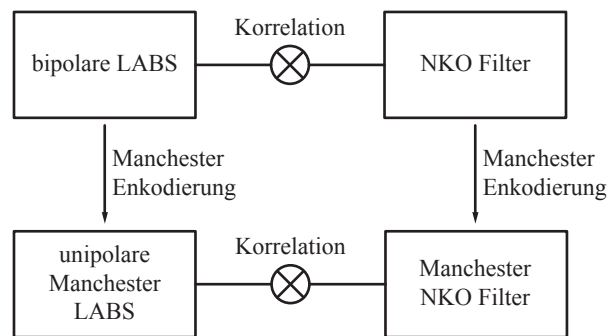


Abb. 3.12: Signalverarbeitung bipolarer LABS per NKO Filter (oben) und Verarbeitung Manchester transformierter LABS per Manchester transformiertem NKO Filter (unten).

3.9 Komplementäre Codes

Komplementäre Codes sind eine Klasse von Sequenzen, die bipolar vorliegen und immer paarweise (S_1, S_2) verwendet werden. Sie besitzen die Eigenschaft, dass eine Pulskompression durch geschickte Signalverarbeitung ohne Signalnebenkeulen erzielt werden kann. Dies setzt jedoch voraus, dass beide Sequenzen über ein entsprechendes Modulationsschema implementiert werden können. Die Realisierung multipler Detektionspfade ist somit eine Grundvoraussetzung ihrer Verwendbarkeit. Wegen ihres speziellen Verwendungszwecks werden Komplementäre Sequenzen in dieser Arbeit der Vollständigkeit halber erwähnt und kurz beschrieben, nicht jedoch tiefergehend analysiert.

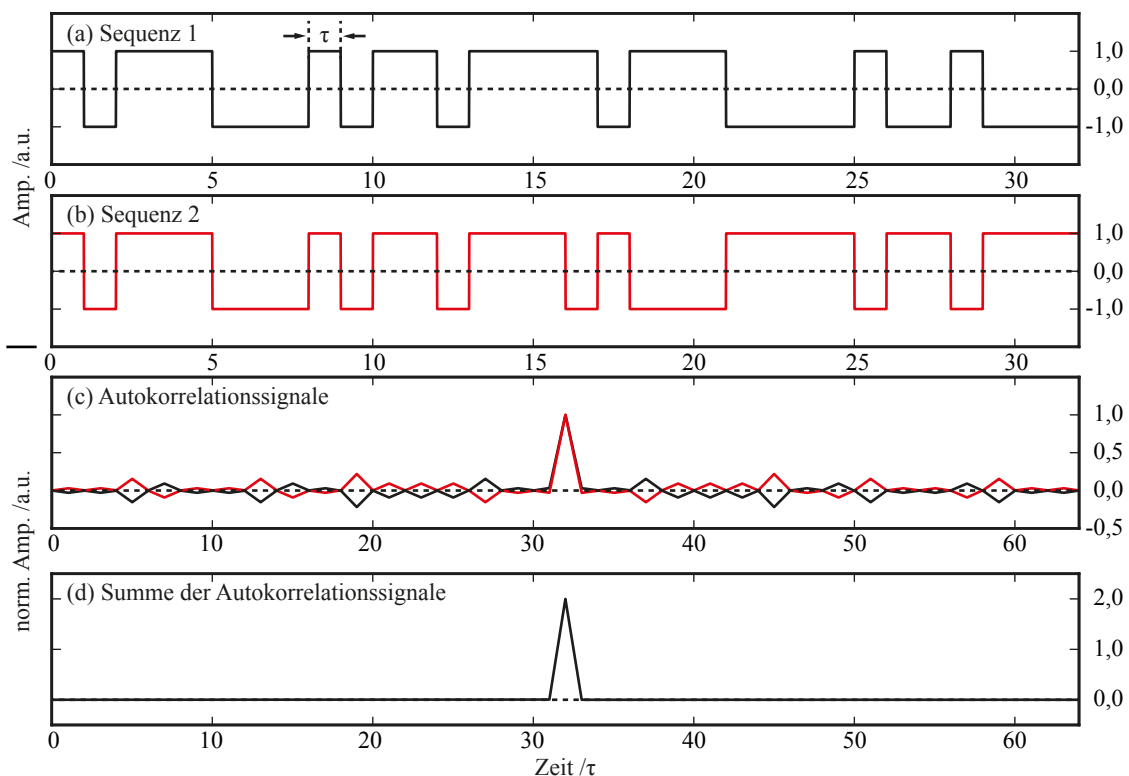


Abb. 3.13: Bipolare Komplementär-codes (a) und (b) sind hochsymmetrisch und besitzen Autokorrelationssignale mit invertierten Signalnebenkeulen (c). Die Addition beider Autokorrelationssignale resultiert in einem Signal, das keinerlei Signalnebenkeulen zeigt (d).

Komplementäre Sequenzen sind hochsymmetrisch (Abb. 3.13 (a), (b)) und besitzen die Eigenschaft, dass ihre Autokorrelationssignale (c) entgegengesetzte, d.h. invertierte Signalnebenkeulen besitzen. Die Addition beider Autokorrelationssignale führt daher zu einem Signal, das keinerlei Signalnebenkeulen besitzt (d).

Die Symmetrieeigenschaften ihrer Autokorrelationssignale liegt bereits in der Wahl der Sequenzen S_1 und S_2 begründet [32, 37]. So lassen sich passende Code-Paare aufgrund von Symmetrieeigenschaften suchen oder gar konstruieren (Abb. 3.14 links). Der Vorteil einer gezielten Suche liegt darin, dass Sequenzen aller Längen in Betracht gezogen werden können, während ein rekursives Konstruktionsverfahren in Längen von $N = 2^{(n+1)}$ (n Iterationsschritte) resultiert.

Das rekursive Konstruktionsverfahren startet in der Regel mit zwei Sequenzen (S'_1, S'_2) der Längen $N' = 2$, die bereits als komplementäres Code-Paar identifiziert wurden. In Abhängigkeit dieses Startpaares ergibt sich dann ein Spektrum unterschiedlicher Komplementärer Codes (Abb. 3.14 links) verschiedener Längen.

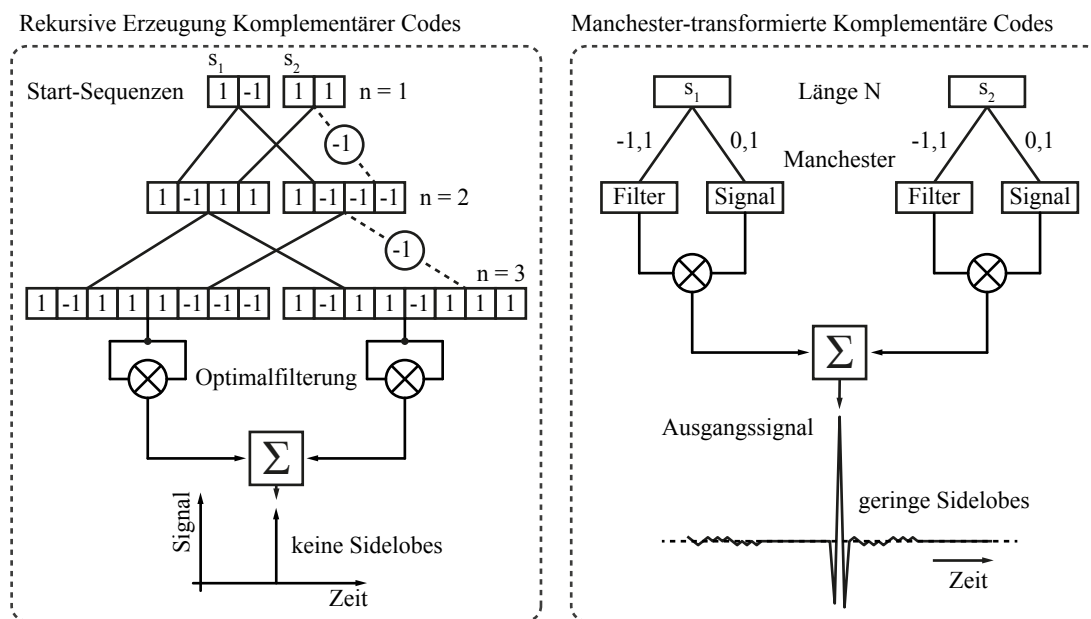


Abb. 3.14: Rekursive Konstruktion Komplementärer Codes (links) und Manchester-Transformation der Paare (rechts). Die rekursive Konstruktion Komplementärer Codes startet mit zwei Sequenzen S'_1 und S'_2 , die bereits als solche identifiziert wurden. Gemäß des gezeigten Schemas können Sequenzen der Längen $N = 2^{(n+1)}$ erzeugt werden, wobei n die Iterationsschritte sind. Die Verarbeitung Manchester-transformierter Komplementärer Codes resultiert immer in Ausgangssignalen, die in der positiven Halbebene Signalnebenkeulen mit einer maximalen Amplitude von 1 aufweisen.

Komplementäre Code-Paare liegen immer in bipolarer Notation vor, können jedoch über Manchester-Transformation in eine unipolare Gestalt überführt werden (Abb. 3.14, rechts). Die Konstruktionsvorschriften für Signal und Filter jeder Sequenz entsprechen dabei derjenigen in Tab. 2. Im Gegensatz zur bipolaren Ausführungsweise, entstehen bei der Verarbeitung Manchester-transformierten Komplementärer Codes geringe Signalnebenkeulen, die den Absolutwert von 1 jedoch nicht überschreiten (siehe auch [39]).

3.10 Geschwindigkeitsanpassung der Filter

In Kap. 1 wurde bereits vorweggenommen, dass das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz vor allem zur Geschwindigkeitsmessung von Zellen genutzt wird. Als Pendant zum Streusignal der klassischen Durchflusszytometrie kann die Geschwindigkeitsinformation neben der Fluoreszenzintensität als

Merkmal zur Unterscheidung von Zellpopulationen genutzt werden, wie anhand des Streudiagramms (Abb. 1.2) exemplarisch gezeigt ist. In diesem Abschnitt wird daher auf die Geschwindigkeitsanpassung der Pulskompressionsfilter eingegangen, die in Kap. 1.4 bereits kurz beschrieben wurde.

3.10.1 Geschwindigkeitsauflösung

Die Fluoreszenzsignale verschieden schneller Zellen unterscheiden sich bei konstanter Abtastrate primär in der Zahl an Signalabtastungen, die von einem Analog-Digital-Wandler (engl. analog-to-digital converter, ADC) beim Durchlaufen der Zellen vorgenommen wird. Je höher die Abtastrate gewählt wird, desto höher ist das zeitliche Auflösungsvermögen der Messung. Dies soll anhand folgender Rechnung verdeutlicht werden:

Die Geschwindigkeitsdifferenz Δv zweier Partikel mit Geschwindigkeiten v_1 und v_2 ist gegeben mit

$$\Delta v = L \left(\frac{1}{t_1} - \frac{1}{t_2} \right) \quad (127)$$

$$= L \left(\frac{f_s}{N_1} - \frac{f_s}{N_2} \right) \quad (128)$$

$$= f_s L \left(\frac{1}{N_1} - \frac{1}{N_2} \right). \quad (129)$$

L bezeichnet dabei die Länge der Maske und f_s die Abtastrate. t_1 und t_2 bezeichnen die Verweilzeiten der Zellen in der Detektionszone und N_1 und N_2 die Zahl der Abtastung, die sich für beide Zellen jeweils ergibt. Wählt man $N_1 = N$ und $N_2 = N + \Delta N$, sodass $v_1 > v_2$ ist, so erhält man:

$$\Delta v = f_s L \left(\frac{\Delta N}{N(N + \Delta N)} \right) \quad (130)$$

$$= \underbrace{\frac{f_s}{N}}_{v_N} L \left(\frac{\Delta N}{N + \Delta N} \right) \quad (131)$$

$$(132)$$

Wenn sich zwei Signale bei großem N um eine Abtastung ($\Delta N = 1$) unterscheiden, so lässt sich Gl. 130 vereinfachen zu:

$$\Delta v \approx \frac{v_N}{N}. \quad (133)$$

Obige Rechnung zeigt, dass die Geschwindigkeitsauflösung bei einer Geschwindigkeit v_N von der Zahl der Abtastungen und somit von der Abtastrate f_s abhängt. Beispielsweise ergibt sich für $N = 1000$ Signalabtastungen und $v_N = 100 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ eine Geschwindigkeitsauflösung von $\Delta v = 0,1 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$. Für die doppelte Abtastrate ergibt sich bereits eine Auflösung von $\Delta v = 0,5 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$. Durch das Auflösungsvermögen der Messung kann eine entsprechend große Schar an digitalen Filtern erzeugt werden, die jeweils auf eine andere Geschwindigkeit resonant sind und im Folgenden als ‘Geschwindigkeitskanäle’ bezeichnet werden.

Die Wahl von f_s hängt neben der gewünschten Auflösung Δv auch von der Länge L der Detektionszone und der binären Länge N der Maske ab, da beide Größen die zeitliche Länge τ des kürzesten Sub-Pulses

definieren. Ein ADC muss nach Nyquist mindestens die doppelte Abtastrate der zu erwartenden Signalbandbreite besitzen. Typischerweise wählt man für die Abtastrate jedoch einen Wert, der mindestens dem zehnfachen der zu erwarteten Bandbreite entspricht.

Erwartet man beispielsweise eine Geschwindigkeitsverteilung um einen Wert von $v_N = 200 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ bei einer Maskenlänge von $L = 1 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ und einer binären Modulationssequenz der Länge $N = 42$, so ergibt sich für τ ein Wert von etwa 12 ms. Bei zehnfacher Überabtastung resultiert daraus eine Abtastrate von 84 kps (engl. für kilo samples per second). Die Geschwindigkeitsauflösung, die sich bei dieser Abtastrate ergibt, liegt bei ca. $0,5 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$.

Werden neben dieser Geschwindigkeitspopulation weitere Ereignisse bei höheren Geschwindigkeiten erwartet, so muss die Abtastrate entsprechend erhöht werden, sofern eine Mindestauflösung von $0,5 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ beibehalten werden soll. Eine Erhöhung der Abtastrate bedeutet jedoch immer einen höheren Rauschanteil im Rohdatensignal, da die Bandbreite der Messung vergrößert wird.

Die Anpassung der Filter auf verschiedene Resonanzgeschwindigkeiten verlangt eine Streckung der Filter aus ihrer Ursprungslänge M auf die gewünschten Ziellänge. Bei Sequenzlänge von $N = M = 42$ (Balanciertes Filter) und einer Ziellänge von beispielsweise $ZM = 840$ Abtastungen, müsste der Wert eines jeden Bits der Sequenz 20 Mal ($Z = 20$) wiederholt werden, um ein Filter für die erwartete Zellsignatur zu konstruieren.

Die Wiederholung jeden Bits um einen ganzzahligen Wert stellt die einfachste Möglichkeit dar, Filter an ein bestimmtes Geschwindigkeitsspektrum anzupassen. Dies hat jedoch den Nachteil, dass, bezogen auf die hohe Abtastrate, nur ein grobes Geschwindigkeitsspektrum realisiert werden kann. Für obiges Beispiel würde die nächsthöhere Geschwindigkeit $(Z - 1)M = 19 \times 42 = 798$ Abtastungen entsprechen, die nächsttiefere $(Z + 1)M = 21 \times 42 = 882$. Gemäß der Beziehung

$$\frac{v_2}{v_1} = \frac{Z_1}{Z_2}, \quad (134)$$

ergeben sich somit prozentuale Abweichungen von $5,3\% (= \frac{20}{19} - 1)$ und $-4,8\% (= \frac{20}{21} - 1)$ beider Kanäle von der mittleren Geschwindigkeit. Die resultierende Geschwindigkeitsauflösung nach dieser Konstruktionsmethode liegt somit fern der maximal erreichbaren Auflösung von $0,12\%$ bei $ZM = 840$ Abtastungen (Gl. 133).

Die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen über ihre Geschwindigkeitsinformation verlangt oftmals eine höhere Geschwindigkeitsauflösung, als dies mit ganzzahligen Vielfachen Z der Grundlänge N der Sequenz zu erreichen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe eine lineare Längenskalierung der Filter bei einer minimalen Schrittweite von einem Sample ($\Delta N = 1$) vorgenommen werden kann.

3.10.2 Lineare Längenskalierung der Filter und Rundungsfehler

Bei der linearen Längenskalierung eines Pulskompressionsfilters tritt oft die Schwierigkeit auf, dass die gewünschte Ziellänge nicht restlos durch die Zahl der Filterkoeffizienten geteilt werden kann. Beispielsweise müsste man bei einer Ziellänge des Filters von 1000 und einer Grundlänge von $M = N = 42$ (Balanciertes Filter) jeden Filterkoeffizient 23,81 Male wiederholen. Da dies bei zeitdiskreten Signalen nicht möglich ist, muss beim Übergang zwischen zwei Filterkoeffizienten entweder eine Entscheidung für einen der benachbarten Koeffizienten getroffen werden, oder es muss eine Interpolation (Mittelung) zwischen beiden Werten erfolgen.

Bei einem Optimalfilter beispielsweise, der rein binäre Filterkoeffizienten enthalten soll, muss an den Flanken ($0 \rightarrow 1$ bzw. $1 \rightarrow 0$) immer die Entscheidung getroffen werden, ob ein Koeffizient einer Null

oder einer Eins zugeordnet wird. So kann es vorkommen, dass sich die relativen Anteile von Einsen und Nullen bezogen auf die Gesamtlänge des Filters in Abhängigkeit der Resonanzgeschwindigkeit des Filters ändern (Abb. 3.15). Dies führt dazu, dass benachbarte Filter eine unterschiedliche DC-Verstärkung aufweisen und Signaloffsets die Ausgangssignale beeinflussen können.

Nicht nur die Filter werden auf diese Weise generiert, sondern auch sogenannte Referenzsignale (ideale Zellsignaturen), die zur Normierung der Filter erzeugt werden. Eine exakte Normierung der Filter ist Voraussetzung dafür, dass die Signalenergie einer gemessenen Zellsignatur korrekt wiedergegeben wird und eine präzise Zuordnung des Ereignisses zu dem entsprechenden Geschwindigkeitskanal erfolgen kann. Rundungsfehler machen sich schließlich als Amplitudenfehler der Ausgangssignale, d.h. Fehler in der Bestimmung der Signalenergien bemerkbar.

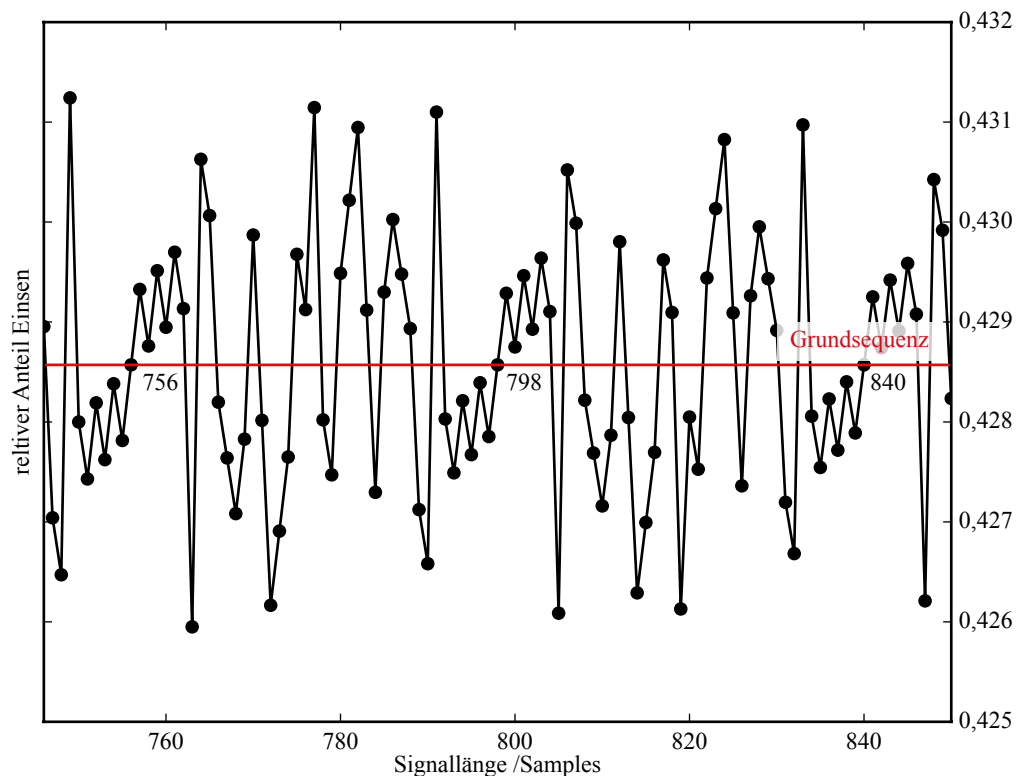


Abb. 3.15: Relativer Anteil an Einsen bei der Streckung einer Sequenz der Länge $N = 42$ (Lfd. Nr. 76, Anh. A) auf ein Längenspektrum, das von 746 bis 840 Filterkoeffizienten reicht. Durch Rundungsfehler kann der relative Anteil von Einsen bei diesem Beispiel im einstelligen Prozentbereich variieren. Somit können beispielsweise aufgrund unterschiedlicher DC-Verstärkung bevorzugte und nicht bevorzugte Kanäle entstehen. Für die Längen 756, 798 und 840 liegt der relative Anteil an Einsen bei dem Sollwert von 0.4286 (rote Linie), da es sich um ganzzahlige Vielfache der Grundlänge 42 handelt. Rundungsfehler treten für diese Längen nicht auf.

Neben der stark variierenden DC-Verstärkung der Filter benachbarter Kanäle, macht sich auch eine abweichende Gestalt der Filter vom physikalischen Signal (engl. mismatch) als Amplitudenfehler bemerkbar. So tritt der Effekt auf, dass abweichende Filterkoeffizienten vom physikalischen Signalverlauf zu einer fehlerhaften Bestimmung der Signalenergie führt, da Signalanteile - vor allem Signalflanken - womöglich nicht durch den Filter berücksichtigt werden. So kann es vorkommen, dass ein zum Resonanzkanal benachbarter Filter eine höhere Ausgangsamplitude liefert, als das eigentliche (resonante) Filter.

Als Konsequenz entstehen bevorzugte und nicht bevorzugte Geschwindigkeitskanäle im Spektrum, was den Zerfall der eigentlichen Verteilung in wenige Kanäle zur Folge hat (vgl. Abb. 3.16, (b)). Im schlimmsten

ten Fall kann das resultierende streifenförmige Streudiagramm nicht mehr interpretiert werden, da die theoretische Auflösung der Messung völlig von den Artefakten der fehlerhaften Energiebestimmung überlagert wird. Da Rundungsfehler sowohl in die Generierung der Filter, als auch in die Generierung der Referenzsignale eingehen, wirken sich die Fehler sogar quadratisch auf die Ermittlung der einzelnen Normierungskonstanten aus.

Selbst bei simulierten Signalen zeigen solche Rundungsfehler erhebliche Effekte im Streudiagramm. So sind starke differenzielle Schwankungen der Ausgangsamplituden (Amplitudenfehler) benachbarter Geschwindigkeitskanäle zu beobachten (vgl. Abb. 3.16, (a), $r = 1\%$). Um einen Zerfall des Geschwindigkeitsspektrums zu vermeiden, sollte für die lineare Längenskalierung der Filter eine Interpolation der Flankenwerte, anstelle einer Entscheidung zwischen einem der beiden Koeffizienten, vorgenommen werden.

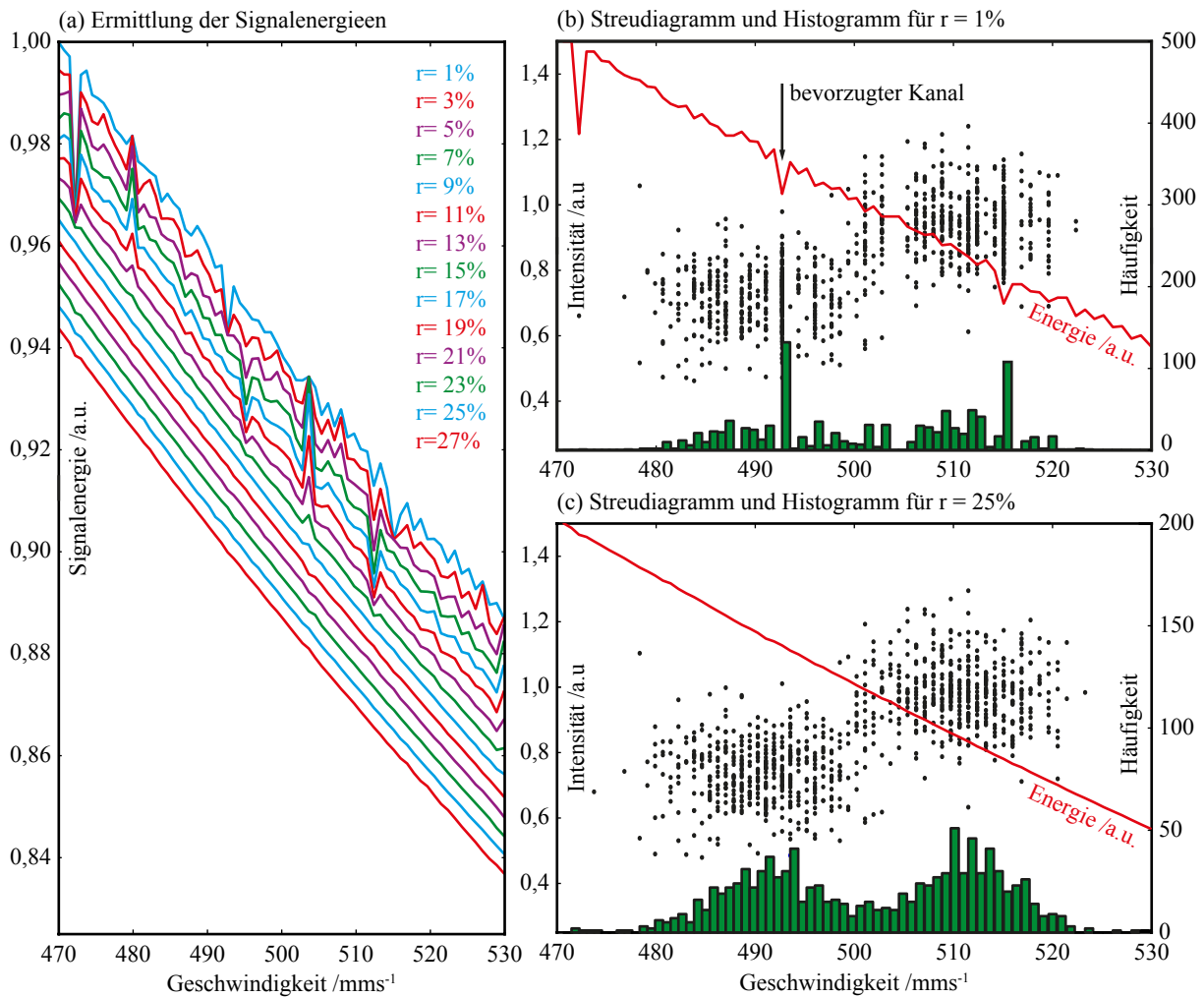


Abb. 3.16: Berechnung der Signalenergie/Normierungskonstanten für interpolierte Filter verschiedener Flankenbreiten r und Geschwindigkeiten aus entsprechenden Referenzsignalen (a). Streudiagramme und Histogramme für Flankenbreiten von $r = 1\%$ (b) und $r = 25\%$ (c). Für steile Flanken (z.B. $r = 1\%$) resultieren kanalübergreifend hohe differenzielle Fehler bei der Ermittlung der Signalenergien (a). Da aus diesen Werten die Normierung der Filter erfolgt, bilden sich im Geschwindigkeitsspektrum für steile Flanken bevorzugte Kanäle aus (b). Diese liegen bei denjenigen Geschwindigkeiten, die den höchsten differenziellen Fehler (Einbrüche) der Signalenergie zeigen. Für zunehmende Flankenbreiten, nähern sich die Verteilungen ihrer tatsächlichen Gestalt an (c). Bei dem Datensatz handelt es sich um eine Simulation, der eine Modulationssequenz der Länge $N = 42$ und das entsprechende Balancierte Filter zugrunde liegen (Lfd. Nr. 76, Anh. A). Als Fensterfunktion wird das sogenannte 'Hann'-Fenster verwendet.

Im einfachsten Fall erfolgt eine Interpolation durch einen einzigen Zwischenwert (Eine Abtastung auf der Flanke). Bei ungünstigen Signal/Filter-Kombinationen und Filterlängen kann dies trotzdem zu großen Fehlern im Ausgangssignal führen: Liegen beispielsweise alle Zwischenwerte eines Kanals zufälligerweise bei einem Wert von 0,5, so tragen bei Optimalfilterung (ideales Filter und Referenzsignal) jeweils zwei Flanken mit Werten von $0,25 + 0,25 = 0,5$ zum Ausgangssignal bei. Befänden sich die Zwischenwerte bei dem direkten Nachbarkanal hingegen immer bei 0,9 und 0,1, so würden zwei Flanken immer einen Wert von 0,82 liefern. Aufsummiert über die gesamte Filterlänge, kommt so eine hohe prozentuale Abweichung der maximalen Signalamplituden zwischen beiden Kanälen zustande. Dieser Effekt führt ebenso zu bevorzugten Kanälen im Geschwindigkeitsspektrum.

Die Amplitudenfehler der Ausgangssignale, die sich bei dieser einfachen (linearen) Interpolationsmethode der Flanken ergeben, lassen sich verringern, indem die Zahl der Zwischenpunkte/Abtastungen, d.h. die Zahl der Punkte auf den Flanken, erhöht wird. Die Fehler, die aus der Quadrierung der Zwischenwerte resultieren, wirken sich dann für benachbarte Kanäle im Mittel gleich aus, sodass sich der relative Fehler zwischen zwei Kanälen verringert. Je mehr Punkte auf den Flanken liegen, desto mehr verliert der differenzielle Amplitudenfehler an Bedeutung und es entstehen homogenere Geschwindigkeitsverteilungen. Dies lässt sich an den Amplitudenwerten (Signalenergieen) in Abb. 3.16 (a) erkennen, die mit steigender Flankenbreite r immer geringere differenzielle Abweichungen zeigen. Die relative Flankenbreite r ist immer im Verhältnis zur Länge eines Einzelpulses angegeben.

Längenskalierung wie auch Flanken Anpassung führen zu weiteren Trendverläufen in Abb. 3.16 (a): Zum Einen nimmt die Signalenergie zu höheren Geschwindigkeiten hin ab, zum Anderen erfolgt eine generelle Abnahme der Signalenergie hin zu breiter werdenden Flanken ($r = 1\% \rightarrow 27\%$).

Die kontinuierliche Abnahme der Signalenergie von geringeren hin zu schnelleren Geschwindigkeiten ist der Tatsache geschuldet, dass die Signallänge und somit die Verweildauer T in der Detektionszone gemäß $\frac{1}{T}$ abnimmt. Eine Abnahme der Signalenergie durch Flankenverbreiterung resultiert hingegen aus oben geschildertem Effekt: Je mehr Werte auf den Flanken liegen, desto mehr Werte < 1 gehen quadratisch in die Berechnung der Signalenergie ein.

Für die richtige Zuordnung der Ereignisse zu den entsprechenden Geschwindigkeitskanälen müssen beide Effekte durch eine Normierung der Filterkoeffizienten kompensiert werden. Die jeweilige Normierungskonstante entspricht dabei dem Inversen der Signalenergie, die mit einem Filter anhand seines Referenzsignals ermittelt wird (Inverser Verlauf der entsprechenden Kurve in Abb. 3.16 (a)).

Es hat sich zudem herausgestellt, dass sich die Gestalt der Verteilungen weiter verbessern lässt, indem die Interpolation der Flanken nicht linear erfolgt (einzelner Zwischenwert), sondern dem echten Signalverlauf angepasst ist (vgl. Abb. 3.16 (c)). Die genaue Vorgehensweise wird im nächsten Abschnitt erläutert.

3.10.3 Interpolation der Filterkoeffizienten

Die Interpolation der Flanken kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. Z.B. wird bei linearer Interpolation der Flankenverlauf durch eine Gerade genähert und die Flankenbreite über deren Steigung eingestellt. Der resultierende, trapezförmige Signalverlauf für jeden Subpuls entspricht dann aber nicht dem realen Signal (siehe Abb. 2.5), das eher abgerundete Flanken aufweist. Um die Signalenergie des Messsignals möglichst genau wiederzugeben, sollten sich Signalfanken und Filterflanken nach Möglichkeit übereinstimmen. Flankenanpassung durch lineare Interpolation ist daher keine geeignete Methode.

Der tatsächliche, zeitliche Verlauf, der sich für reale Signale ergibt, hängt von vielen verschiedenen Parametern ab, von denen nur einige erwähnt sind:

- Verzerrungen durch Abberationen
- Akzeptanzwinkel und 'Field of View' des Objektivs
- Reflexionen des Anregungs-/Fluoreszenzlichts
- Ausleuchtung der Anregungszone (z.B. Gaußförmiges Strahlprofil, 'Laser-Speckle')
- Beugungserscheinungen
- Abschattungseigenschaften der Maske
- Optische Ausrichtungsfehler des Aufbaus
- Räumliche Ausdehnung der Zellen (keine punktförmigen Objekte)

Es ist daher schwer, wenn nicht unmöglich, ein mathematisches Modell der Übertragungsfunktion des Gesamtsystems zu finden, zumal die Justage des optischen Aufbaus von Hand erfolgt. Nichtsdestotrotz können Verläufe gefunden werden, die dem realen Signal sehr ähnlich sind und somit brauchbare Ergebnisse erzielen.

Zur Flankenanpassung werden in dieser Arbeit sogenannte Fensterfunktionen verwendet, die auch in anderen Bereichen der Signalverarbeitung eingesetzt werden. Sie dienen in der Regel dazu, ein Signal innerhalb eines festgelegten Intervalls so zu gewichten (digitale Filterung), dass es zum Rand des Intervalls gegen Null konvergiert. Durch diese Vorgehensweise wird die Bandbreite des Signals eingeschränkt und es kann - je nach verwendetem Fenster - Einfluss auf das Frequenzspektrum genommen werden. Fensterfunktionen haben oft eine Tiefpasscharakteristik und werden z.B. in Verbindung mit Analog-Digital-Wandlern als sogenannte 'Anti-Aliasing-Filter' genutzt.

Die Abrundung von Filtern per Fensterfunktion hat sich für das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz als effektive Methode erwiesen, homogene Geschwindigkeitsspektren zu erzielen. NI LabView bietet in der 'Signal Processing Toolbox' eine große Palette an Fensterfunktionen, die individuell parametrisierbar sind und für die Filter- und Signalanpassung verwendet werden können. Auf eine genaue Beschreibung des Frequenzverhaltens der Fenster wird in dieser Arbeit verzichtet und auf einschlägige Literatur [15] verwiesen.

Zur Generierung der Filter und deren Referenzsignale wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Strategie entwickelt, die auf praktisch jedes Signal und jeden Filter anwendbar ist:

1. Auswahl einer Fensterfunktion.
2. Festlegung des Breitenverhältnis aus Flanke und Sub-Puls.
3. Der Flankenbreite/Breite der Fensterfunktion in Samples wird eine große (ungerade) Zahl W an Samples zugeordnet (z.B. $W = 1001$).
4. Berechnung der Wiederholungen Z für jedes Bit der Originalsequenz anhand der Flankenbreite.

5. Das Filter/Signal wird einem Upsampling unterzogen (Gesamtlänge ZM bzw. ZN).
6. Faltung der Fensterfunktion (Länge W) mit dem Filter/Signal zur Erzeugung des sog. Master-Filters/ der Master-Sequenz (Gesamtlänge $ZN + W - 1$).
7. Downsampling des Master-Filters/ der Master-Sequenz in äquidistanten Schritten (Intervallen) auf die gewünschten Ziellängen zur Erzeugung aller Filter und Referenzsignale des Geschwindigkeitspektrums.
8. Die zeitliche Zentrierung der Filter für gerade/ungerade Ziellängen kann durch einen Offset (halbe Intervallbreite) in Schritt 6 erfolgen.

Diese Strategie kann sowohl zur Erzeugung der Filter als auch der Referenzsignale genutzt werden, sofern die Filterlänge M der Länge der Modulationssequenz N entspricht (z.B. Optimalfilter, Balanciertes Filter). Weicht die Länge M des Filters von der Länge N der Modulationssequenz ab (z.B. NKO Filter), so muss beachtet werden, dass die Längenverhältnisse von Master-Filter und Master-Sequenz nach diesem Verfahren nicht erhalten bleiben.

Beispielsweise resultiert eine Sequenz der Länge ZN nach der Faltung mit einer Fensterfunktion W in einer Sequenz der Länge $ZN + W - 1$. Ein typisches NKO Filter besitzt dann die Länge $Z(3N) + W - 1$, was jedoch nicht der dreifachen Länge der gestreckten Master-Sequenz entspricht. Somit stimmt die Intervallbreite, die beim Downsampling zur Erzeugung der Referenzsignale genutzt wird, nicht mit der Intervallbreite zur Erzeugung der Filter überein. Die Normierung der Filter anhand der erzeugten Referenzsignale wäre dann ebenfalls fehlerhaft.

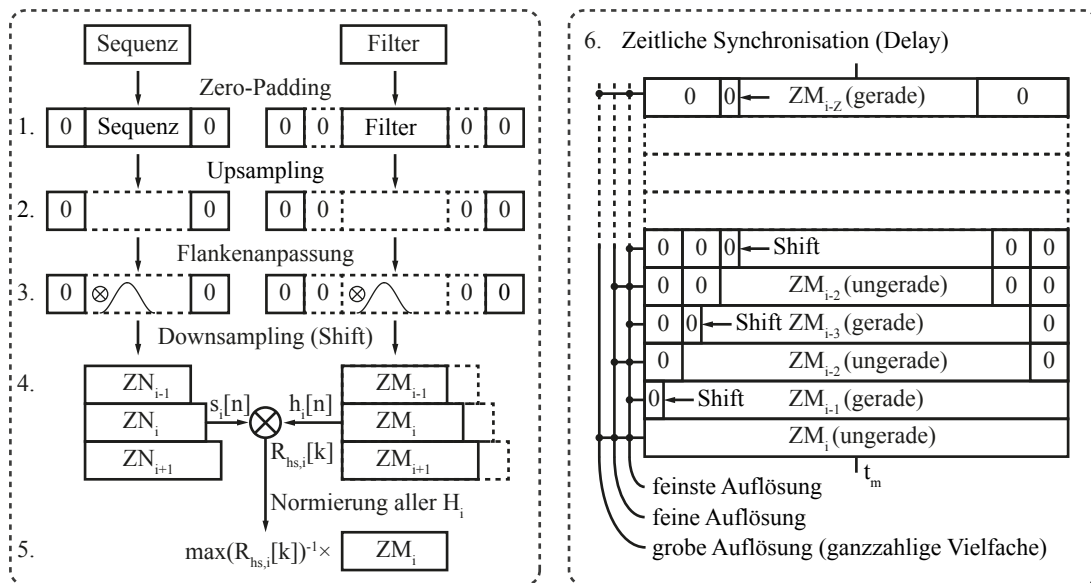


Abb. 3.17: Schema zur Erzeugung von Filtern und Referenzsignalen. 1. LABS und Filter werden zunächst einem Zero-Padding unterzogen. 2. Upsampling von Filter und Sequenz. 3. Flanken Anpassung durch Faltung mit einer Fensterfunktion. 4. Downsampling von Sequenz und Filter auf gewünschte Ziellängen der Filter und Referenzsignalen (Kanäle i) unter Berücksichtigung der Phasen Anpassung und anschließende Normierung. 5. Zeitliche Synchronisation der Filter und Festlegung der Geschwindigkeitsauflösung.

Dieser Problematik kann mit zusätzlichem Zero-Padding begegnet werden. Der ursprünglichen Sequenz wird dazu eine Null am Anfang und am Ende hinzugefügt (Länge $N + 2$). Dem Filter werden ebenfalls Nullen hinzugefügt, deren Zahl sich am Vielfachen der Länge N der Sequenz bemisst (z.B. 3 Nullen am Anfang und Ende für einen Filter der Länge $3N$). Zur Generierung der Filter und Referenzsignale werden dann, analog zur obigen Strategie, zunächst die Schritte 1-6 durchlaufen. Bevor Schritt 7 erfolgt, muss jedoch zunächst die Längenskalierung zwischen Master-Filter und Master-Sequenz wiederhergestellt

werden. Dies geschieht, indem am Anfang und Ende jeweils ein Intervall mit Breite $(W - 1)/2$ entfernt wird, sodass das Master-Filter eine Gesamtlänge $3Z(N + 2)$ und die Master-Sequenz eine Länge von $Z(N + 2)$ aufweist. Diese Vorgehensweise ist möglich, da W per Definition (s.o.) einer ungeraden Zahl entspricht und das eigentliche Master-Filter, bzw. die Master-Sequenz, zentriert im Intervall der Länge $Z(3N) + W - 1$ bzw. $ZN + W - 1$ liegt.

Das hohe Upsampling ($W = 1001$) sorgt für eine hohe Überabtastung der Grundsequenz/ des Filters, so dass Rundungsfehler bei ungeradzahligem Intervalllängen bei Abtastung des Master-Filters/ der Master-Sequenz (Position der Samples) kaum mehr ins Gewicht fallen.

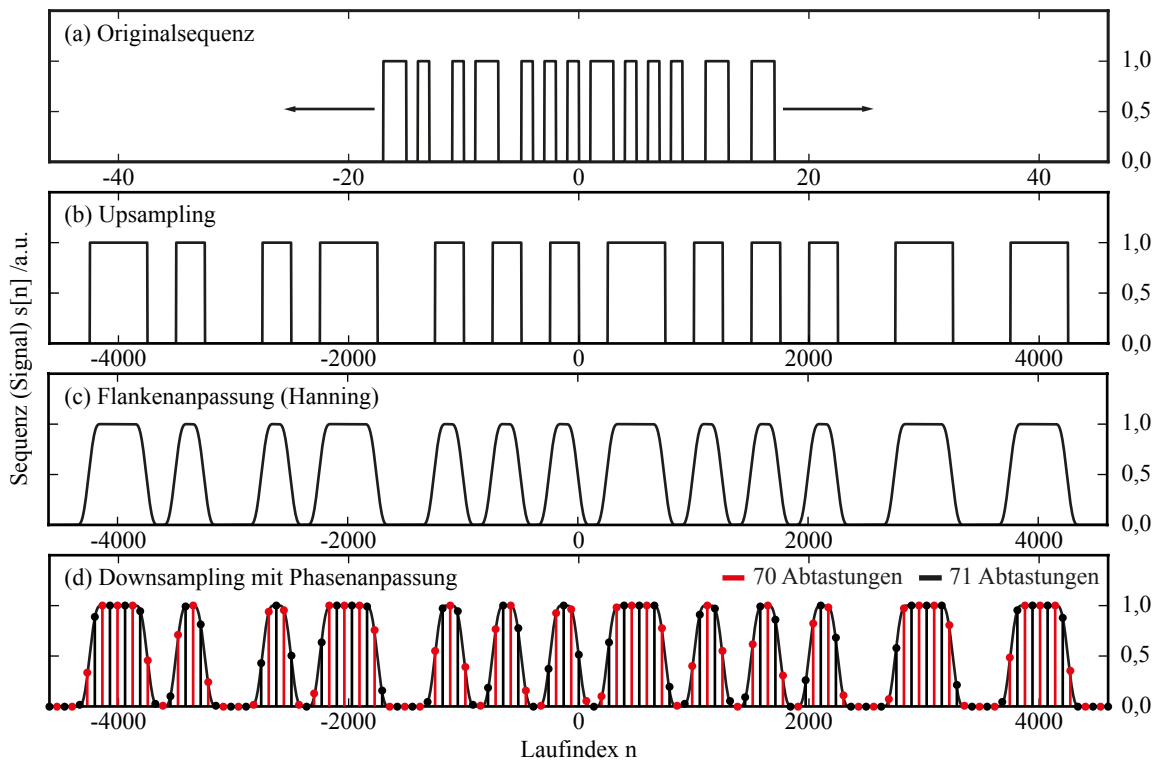


Abb. 3.18: Schema zur Erzeugung von Referenzsignalen der Längen 70 und 71 aus einer Sequenz der Länge 36. (a) Originalsequenz. (b) Streckung der Originalsequenz (Upsampling). (c) Flankenanspassung der Sequenz mit einer Fensterfunktion (hier: 'Hanning'-Fenster mit einer relativen Breite von 25 %). (d) Downsampling der Master-Sequenz auf gewünschte Ziellängen (Referenzsignale) unter Berücksichtigung der Phasenanpassung. Diesem Beispiel liegt eine Manchester-transformierte Sequenz der Länge $N = 18$ zugrunde (Lfd. Nr. 28, Anh. A).

Die verschiedenen Filter besitzen durch ihre Längendifferenzen zudem unterschiedliche Signallaufzeiten. Es ist daher notwendig, alle Filter über sogenannte Zeitverzögerungstrecken (engl. delay) zu synchronisieren. Die Zeitverzögerung entspricht dabei immer der halben Längendifferenz eines benachbarten, langsameren Filters. Wenn ein Filter beispielsweise eine Länge von 800 Samples besitzt und das benachbarte Filter eine Länge von 1000 Samples, so beträgt die Zeitverzögerung, die für das kürzere Signal berücksichtigt werden muss, 100 Samples. Die Verzögerung des Signals wird in der digitalen Signalverarbeitung durch Speicherzellen realisiert. Diese Speicherzellen können dabei auch Teil der Filter sein, deren Filterkoeffizienten an diesen Stellen Null sind (Zero-Padding).

Soll in einem Geschwindigkeitsspektrum die größtmögliche Auflösung mit $\Delta N = 1$ erreicht werden, so unterscheiden sich benachbarte Geschwindigkeitskanäle in ihrer Länge immer um einen Koeffizienten. Bezüglich der Filterlaufzeit müsste somit eine Zeitverzögerung von 0,5 Samples realisiert werden, um eine zeitliche Synchronisation zwischen benachbarten Kanälen zu erzielen. Da dies nicht möglich ist,

erfolgt statt dessen eine Phasenanpassung ‘Shift’ geradzahlicher Filter an ihre ungeradzahlige Nachbarn bereits beim Downsampling (Abb. 3.17, rechts).

Dazu werden bei Kanälen mit geradzahligen Längen die Abtastintervalle der Master-Sequenz/ des Master-Filters um eine halbe Intervallbreite in positiver zeitlicher Richtung (rechts) verschoben und vorne (links) eine Null hinzugefügt. Da der jeweils letzte Abtastwert durch die Verschiebung außerhalb der Gesamtlängen liegt, wird dieser ebenfalls zu Null gesetzt. Dies entspricht ohnehin dem Randwert der Fensterfunktion (Abb. 3.18). Die willkürlich gewählte Phasenlage (Phasenanpassung) zur zeitlichen Synchronisation der Filter ist ebenfalls eine Ursache von Rundungsfehlern und trägt maßgeblich zu den differenziellen Abweichungen der maximalen Signalamplituden benachbarter Kanäle bei.

Den Schritt der Phasenanpassung kann auch umgangen werden, indem man die Abtastrate verdoppelt oder die halbe Geschwindigkeitsauflösung in Kauf nimmt. In beiden Fällen kann die zeitliche Synchronisation der Filter dann durch symmetrisches Zero-Padding (rechts und links) erfolgen. Wählt man hingegen nur ganzzahlige Vielfache der Grundlänge, führt dies in einer groberen Auflösung (Abb. 3.17, rechts) des Geschwindigkeitsspektrums. Trotzdem ist letzere Methode hinsichtlich der Soft- und Hardwareimplementierung die einfachste, eine Filterskalierung vorzunehmen. Gerade bei schneller Hardware mit begrenzten Ressourcen (z.B. FPGA) stellt die grobe Längenskalierung eine Alternative zur Filterinterpolation dar, da die gewünschte Auflösung prinzipiell über die Abtastrate festgelegt werden kann. Bei der Datenauswertung mit gewöhnlichen Computern hingegen, ist eine Filterinterpolation aufgrund der anfallenden Datenmenge zu empfehlen.

Unabhängig davon welche Konstruktionsmethode gewählt wird, resultiert aus der Filteranpassung eine Schar an Filtern, mit denen ein gewisses Geschwindigkeitsspektrum abgefragt werden kann. Diese Filter werden im Folgenden mit H_ν mit Filterkoeffizienten $h_\nu[n]$ bezeichnet, wobei ν die jeweilige Resonanzgeschwindigkeit ist. Die Filterung des Messsignals $x[n]$ auf verschiedenen Geschwindigkeitskanälen resultiert dann einer zweidimensionalen Korrelationsmatrix gemäß:

$$R_\nu[n] = R_{h_\nu x} = \sum_k h_\nu[k] x[n+k]. \quad (135)$$

4 Charakterisierung von LABS

Das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz kann entweder für reine Zähl Anwendungen eines bestimmten Zelltyps verwendet werden (z.B. für zirkulierende Tumorzellen), oder zur Unterscheidung verschiedener Zellpopulation anhand der zellspezifischen Geschwindigkeitsinformation. Während die Geschwindigkeitsinformation bei Zähl Anwendungen eine untergeordnete Rolle spielt, sind dort die zeitliche Auflösung und eine geringe Falscherkennungsrate in einem engen Geschwindigkeitsfenster entscheidende Kriterien. Wird das Verfahren hingegen zur genauen Geschwindigkeitsmessung verwendet und sind zudem nur geringe Zählraten erforderlich, ist eine niedrige Falscherkennungsrate auf nicht-resonanten Geschwindigkeitskanälen erwünscht. Falscherkennungen treten vor allem dann auf, wenn hohe Signalnebenkeulen auf den nicht-resonanten Geschwindigkeitskanälen zu erwarten sind.

LABS werden immer für schmalbandige Anwendungen gesucht. Beispielsweise erfolgt die Geschwindigkeitsmessung in der RADAR-Technik über die Doppler-Verschiebung der Trägerfrequenz des abgestrahlten Signals. Die zeitliche Länge τ der Sub-Pulse im sogenannten Basisband, bleibt davon nahezu unberührt. Sämtliche theoretischen Betrachtungen, die in einschlägiger Literatur zur RADAR-Technik zu finden sind, sind daher nicht auf das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz übertragbar. Lediglich der resonante Geschwindigkeitskanal bildet eine Ausnahme.

Die theoretischen Betrachtungen und Simulationen in diesem Kapitel gliedern sich daher in drei Teile: Anhand bekannter Literatur der RADAR-Technik wird zunächst der Resonanzfall betrachtet und alle zugrunde liegenden Bewertungskriterien resümiert. Im zweiten Abschnitt des Kapitels wird die Messung enger Geschwindigkeitsverteilungen nach dem Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz in Betracht gezogen und eine Abschätzung über die Geschwindigkeitstoleranz bzw. Geschwindigkeitsauflösung von LABS gemacht. Der letzte Abschnitt beschäftigt sich schließlich mit breiten Geschwindigkeitsverteilungen. Dort wird gezeigt, dass die Bewertungskriterien des Resonanzfalls für breite Geschwindigkeitsverteilungen nicht mehr gelten und erweitert werden müssen. So können Signale, die auf dem resonanten Geschwindigkeitskanal nur geringe Signalnebenkeulen aufweisen, durchaus hohe Signalnebenkeulen auf nicht-resonanten Geschwindigkeitskanälen produzieren.

4.1 Resonanzfall

Bipolare LABS werden für RADAR-Anwendungen anhand des sogenannten Merit-Faktors F gesucht [48–51], der sich für Autokorrelationssignale gemäß

$$F = \frac{N^2}{2E'} \quad (136)$$

berechnet. N entspricht dabei der Länge der betrachteten Sequenz, E' ist die Energie, die sich in den Signalnebenkeulen des sogenannten aperiodischen Autokorrelationssignals C_{SS} einer Sequenz S befindet. C_{SS} ist definiert zu:

$$C_{SS}[k] = \sum_{n=1}^{N-k} s[n]s[n+k]. \quad (137)$$

Die Energie E' berechnet sich dann über:

$$E'(S) = \sum_{k=1}^{N-1} C_{SS}^2(k). \quad (138)$$

Da die Autokorrelationsfunktion symmetrisch ist, reicht es den Betrag der Energie E' nur für positive Zeitverschiebungen zu berechnen und dann zu verdoppeln, um die Gesamtenergie E der Signalnebenkeulen zu erhalten. Die Energie des Hauptpeaks ist mit N^2 gegeben, sodass F das Verhältnis aus Energie des Hauptpeaks und Energie der Signalnebenkeulen ausdrückt. Der Merit-Faktor kann jedoch nur für symmetrische Ausgangssignale, d.h. für Optimalfilter, zum Vergleich von LABS herangezogen werden. Für alle anderen Pulskompressionsfilter sind die Ausgangssignale asymmetrisch, sodass das allgemeinere $ISLR$ (Gl. 112) oder $PSLR$ (Gl. 111) verwendet werden müssen. Für symmetrische Signale entspricht das $ISLR$ dem Merit-Faktor, der der Vollständigkeit halber in Anh. A zu jeder Sequenz angegeben ist (bipolare Ausführungsform).

Sofern $ISLR$ und $PSLR$ logarithmisch angegeben sind, findet die Umrechnung in dieser Arbeit gemäß der Konvention

$$ISLR \longrightarrow 20 \log(ISLR) \quad (139)$$

$$PSLR \longrightarrow 20 \log(PSLR) \quad (140)$$

statt. Dabei wird vorausgesetzt, dass es sich bei den Korrelationssignalen immer um Spannungswerte handelt.

4.2 Enge Geschwindigkeitsverteilungen

Bei reinen Zählenwendungen ist es oftmals nicht notwendig, eine hohe Geschwindigkeitsauflösung der Messung zu erzielen. Insbesondere beim Zählen eines bestimmten Zelltyps, dessen Population nur geringfügig um eine mittlere Geschwindigkeit streut, sind eher hohe Zählraten mit präzisen Resultaten gefragt (z.B. CD4-Count). Dies lässt sich am besten mit solchen LABS realisieren, die eine hohe Geschwindigkeitstoleranz aufweisen und nach der Pulskompression möglichst geringe Signalnebenkeulen auf dem resonanten Geschwindigkeitskanal zeigen. Eine hohe Geschwindigkeitstoleranz geht immer mit einer schlechten Geschwindigkeitsauflösung einher und hat für reine Zählenwendungen den Vorteil, dass das Geschwindigkeitsspektrum theoretisch ohne negative Falscherkennungsrate (*engl. fails negative*) in groben Schritten (z.B. in 5 % Schritten) abgefragt werden kann. Neben dem Vorteil, dass Zellen nicht durch das grobe Geschwindigkeitsraster fallen, müssen ferner geringere Hardware-Ressourcen zur Signalverarbeitung aufgebracht werden.

Die Geschwindigkeitsauflösung von LABS kann bestimmt werden, indem eine entsprechende Filterbank (z.B. Balanciertes Filter) für ein Geschwindigkeitsspektrum generiert wird und dann von einem Testsignal mittlerer Geschwindigkeit v_m durchlaufen wird. Jedes Filter liefert dann gemäß seiner Resonanzgeschwindigkeit ein Signal $R_v[n]$, das zum Zeitpunkt $n = 0$ für jeden Kanal betrachtet wird (Abb. 4.1).

Für die Charakterisierung der Geschwindigkeitsauflösung wird in dieser Arbeit ein Geschwindigkeitsspektrum von $0,5v_m$ bis $2v_m$ um eine mittlere Geschwindigkeit v_m betrachtet, da dies sicher die Geschwindigkeitsverteilungen einschließt, die bislang in Messungen beobachtet wurden. Zur Generierung

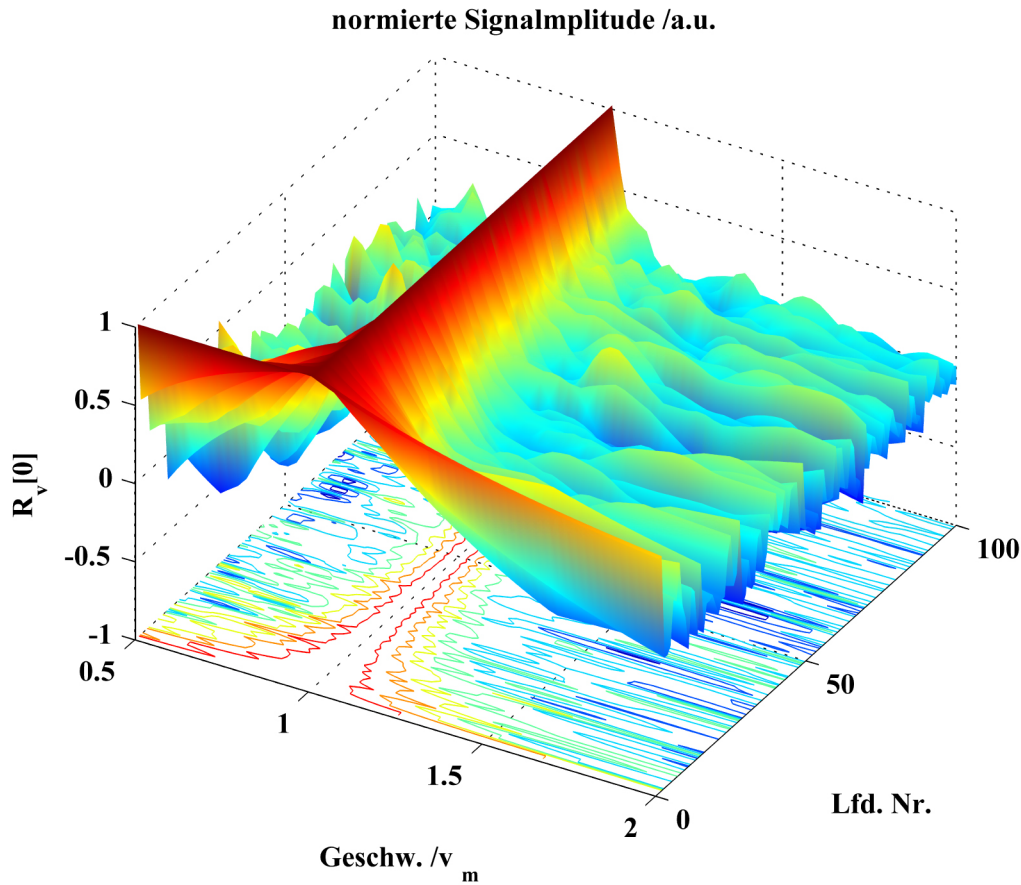


Abb. 4.1: Normierte Korrelationsergebnisse $R_v[0]$ des Balancierten Filters in einem Geschwindigkeitsfenster von $0,5v_m$ bis $2v_m$ entlang der Geschwindigkeitsachse. Gezeigt sind T1-transformierte Sequenzen mit Lfd. Nr. 1 bis 100 (Längen $N = 2$ bis $N = 59$).

der Filterbank wird im ersten Schritt die Geschwindigkeitsauflösung festgelegt. Dies kann beispielsweise über die Zahl der Samples n_{\min} erfolgen, die bei v_{\max} ein Bit der Sequenz repräsentieren. Wählt man beispielsweise $n_{\min} = 10$ für ein Bit bei v_{\max} , so entspricht ein Bit $2n_{\min} = 20$ Samples bei v_m .

Für die hier durchgeführte Untersuchung erfolgt eine grobe Rasterung des Geschwindigkeitsspektrums, um Rundungsfehler zu vermeiden. Die Zahl der Samples pro Bit erhöht sich daher in ganzen Schritten von v_{\max} hin zu v_{\min} . Gemäß obigen Beispiel mit $n_{\min} = 10$, würden sich beispielsweise 10 Kanäle zwischen v_{\max} und v_m und weitere 20 Kanäle zwischen v_m und v_{\min} befinden. Allgemein lässt sich die Zahl der (grob gerasterten) Kanäle K im Geschwindigkeitsintervall $0,5v_m$ bis $2v_m$ berechnen über

$$K = 3n_{\min} + 1. \quad (141)$$

Die Geschwindigkeitsauflösung um die Peak-Position beträgt für obiges Beispiel ca. 5 %. Diese Auflösung hat sich jedoch für die Untersuchung von LABS mit Längen bis zu $N = 100$ als zu gering erwiesen (Abb. 4.2 (a)), da die Auflösungsgrenze von den schmalen Peaks längerer Sequenzen unterschritten wird.

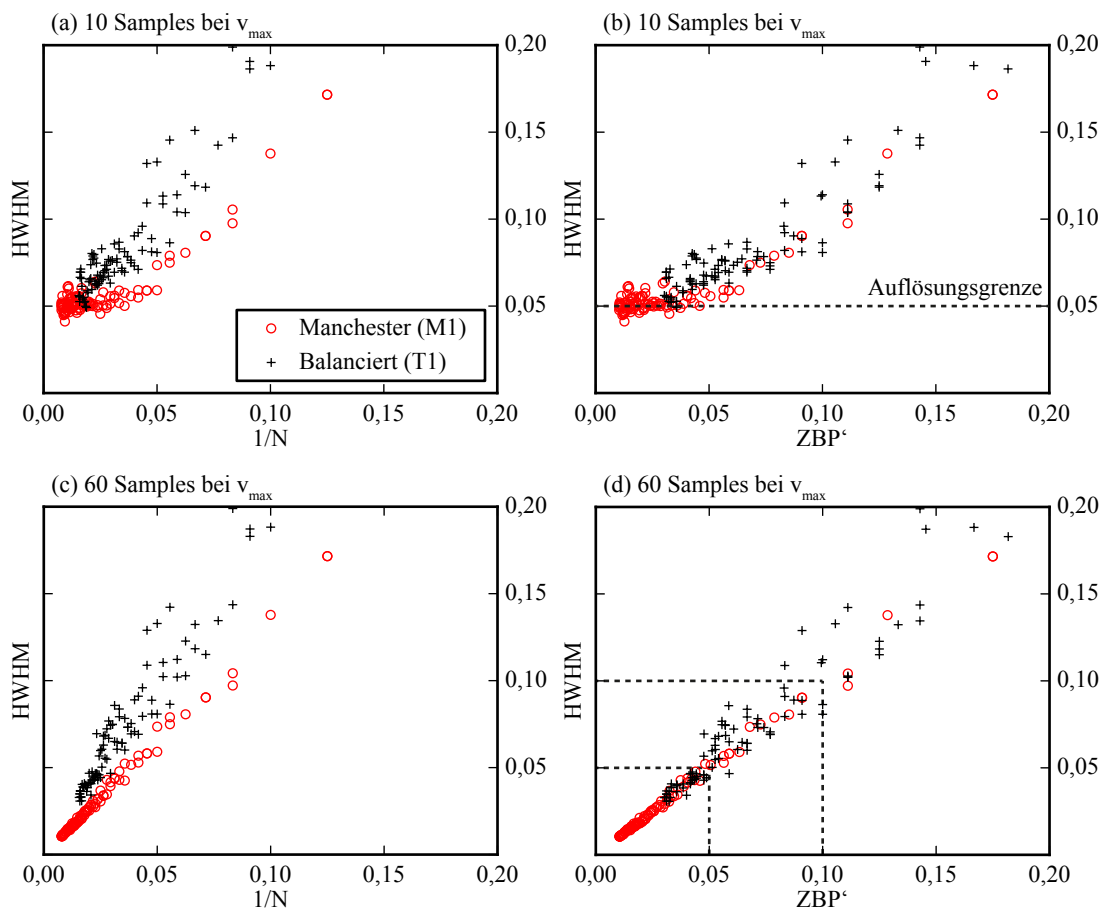


Abb. 4.2: Geschwindigkeitstoleranz/Geschwindigkeitsauflösung von LABS. Gezeigt sind die Peak-Halbwertsbreiten (HWHM) in Abhängigkeit der inversen Länge (a),(c) und in Abhängigkeit des effektiven Zeit-Bandbreiten-Produkts ZBP' (b),(d). Wird die über n_{\min} festgelegte Auflösung zu gering gewählt (z.B. 10 Samples), kann die Peak-Breite für lange Sequenzen nicht ermittelt werden, da die Auflösungsgrenze unterschritten wird. Erst bei höheren Auflösungen wie $n_{\min} = 60$ kann das HWHM für Sequenzlängen bis $N = 100$ bestimmt werden. Bei der Auftragung des HWHM gegenüber des ZBP' erkennt man eine lineare Abhängigkeit (d), die für kurze Sequenzlängen starke Abweichungen vom Trendverlauf zeigen kann.

D.h., dass die Halbwertsbreiten der Peaks auf der Geschwindigkeitsachse geringer als das Auflösungsvermögen der Filterbank sind. Die genaue Peak-Breite lässt sich daher nicht bestimmen und konvergiert für längere Sequenzen gegen die Auflösungsgrenze. Mit $n_{\min} = 60$ wird hingegen eine Auflösung von 0,8 % erreicht, die für die untersuchten Längen ausreichend ist (Abb. 4.2 (c)). Die Bestimmung der Peak-Breite auf der Geschwindigkeitsachse kann durch eine lineare Interpolation (feine Rasterung, z.B. 10000 Kanäle) des Geschwindigkeitsspektrums weiter verbessert werden. Dann kann die Halbwertsbreite der Peaks (engl. *half width half maximum*, *HHWM*) genau abgelesen werden.

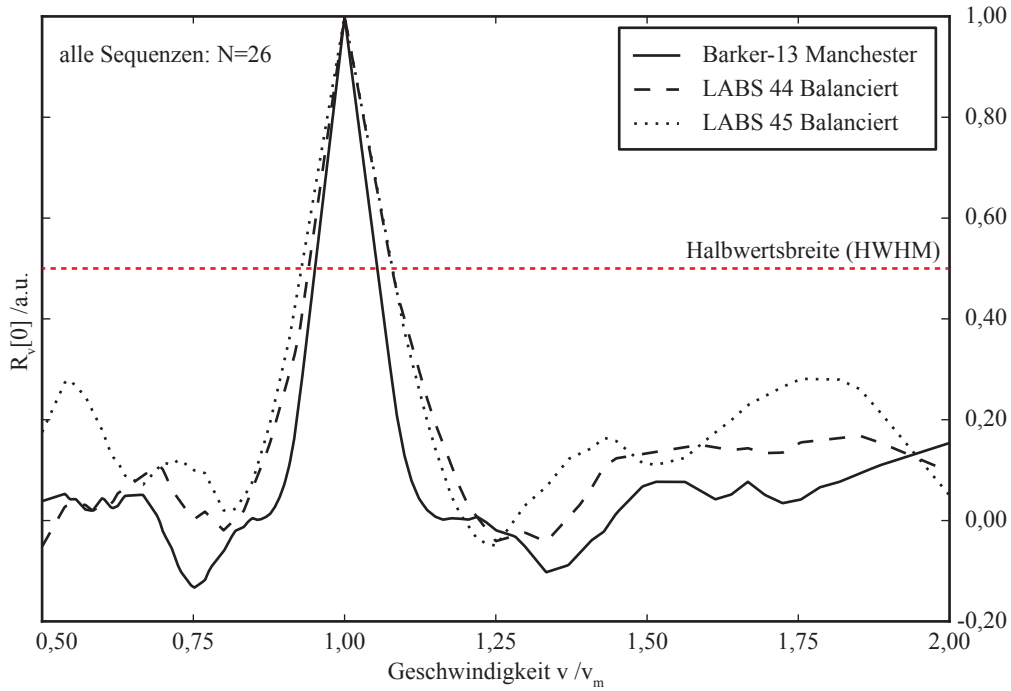


Abb. 4.3: Normierte Korrelationsergebnisse $R_v[0]$ des Balancierten Filters in einem Geschwindigkeitsfenster von $0,5 v_m$ bis $2 v_m$ entlang der Geschwindigkeitsachse. Gezeigt sind LABS der Länge $N = 26$, die sich nach T1 Transformation aus den LABS mit Lfd. Nr. 44 und 45, sowie nach M1 Transformation aus LABS 19 (Barker-13 (M1)) ableiten. Es ist deutlich zu erkennen, dass diejenigen Sequenzen mit dem geringsten ZBP' (Barker-13 (M1)) die höchste Geschwindigkeitsauflösung bzw. geringste Geschwindigkeitstoleranz aufweisen. LABS 44 und LABS 45 zeigen in etwa das gleiche Auflösungsvermögen.

Erfahrungsgemäß zeigen längere Sequenzen eine höhere Geschwindigkeitsauflösung bzw. schlechtere Toleranz gegenüber Geschwindigkeitsabweichungen, als kürzere. Daher bietet es sich an, die Peak-Breite (HHWM) gegen die inverse Länge $1/N$ der Sequenzen aufzutragen (Abb. 4.2 (a),(c)). Man kann bei dieser Auftragung jedoch erkennen, dass Manchester-transformierte Sequenzen (M1) einem anderen Trendverlauf folgen, als LABS, die nach Vorschrift T1 transformiert sind³. Ein wesentlicher Unterschied zwischen T1- und M1- transformierten LABS gleicher Länge besteht darin, dass bei Manchester Sequenzen nur binäre Strukturgrößen der Längen 1 und 2 vorkommen, bei T1 transformierten LABS jedoch deutlich längere Strukturgrößen auftreten können. Daher wird die durchschnittliche Strukturgröße \bar{s} als Korrekturfaktor herangezogen und ein 'effektives Zeit-Bandbreiten-Produkt' ZBP' definiert mit:

$$ZBP' = \frac{\bar{s}}{N}. \quad (142)$$

³ Gleiches gilt für T2 und M2 transformierte Sequenzen

Beispiel: Eine Sequenz S der Länge $N = 11$ sei gegeben mit 10001001101. S besitzt insgesamt 4 Strukturen der Länge 1, 2 Strukturen der Länge 2 und 1 Struktur der Länge 3. Die durchschnittliche Strukturgröße \bar{s} beträgt somit:

$$\frac{4}{7}1 + \frac{2}{7}2 + \frac{1}{7}3 = \frac{11}{7} \approx 1,57. \quad (143)$$

Das ZBP' nimmt somit einen Wert von 0,1427 an.

Trägt man das HWHM schließlich gegen das ZBP' auf, so erhält man für alle Sequenzen einen in etwa linearen Verlauf, der unabhängig von der Transformation ist (Abb. 4.2 (d)). Ohne weitere mathematische Begründung zu liefern, scheint das HWHM dem ZBP' bei hohen Sequenzlängen sogar zu entsprechen. Diese Aussage wird jedoch ausdrücklich mit Vorbehalt getroffen. Eine Erklärung könnte beispielsweise über die Bandbreite der (Zufalls-) Sequenzen erfolgen: Mit steigender Bandbreite, d.h. Länge der Sequenz, nähert sich das Frequenzspektrum der Sequenz dem von weißem Rauschen an, das zu verschiedenen Zeitpunkten keinerlei Korrelation aufweist (Gl. 84). Dies gilt selbstverständlich auch für die Korrelation verschiedener Rauschsequenzen zu allen Zeitpunkten. Die Bandbreite erhöht sich dabei linear mit der Länge N der Sequenz. Für den Grenzfall einer unendlich langen ($N \rightarrow \infty$) Modulationssequenz unterscheiden sich die Signale/Filter zweier benachbarter Kanäle bereits so stark, dass keine Korrelation mehr zustande kommt (maximal unähnlich). Die effektive Bandbreite und somit die effektive Länge einer Sequenz wird jedoch eingeschränkt durch die durchschnittliche Breite der Features, sodass der Korrekturfaktor der effektiven Feature-Breite zur Geschwindigkeitsauflösung berücksichtigt werden muss.

In Abb. 4.3 werden die Peak-Breiten von drei Sequenzen der Länge $N = 26$ auf der Geschwindigkeitsachse verglichen. Obwohl für alle Sequenzen die gleiche Länge N vorliegt, unterscheiden sich die Sequenzen in ihrer Geschwindigkeitsauflösung bzw. Geschwindigkeitstoleranz deutlich. Die verwendeten LABS mit Lfd. Nr. 44 und 45 besitzen eine Signalenergie von $E = 11$ bzw. $E = 16$ (Summe über die Sequenz), während die Barker-13 (M1) Sequenz eine Signalenergie von 13 aufweist. Dies verdeutlicht, dass die Geschwindigkeitsauflösung nicht zwangsläufig von der Signalenergie abhängt, sondern neben der Länge N hauptsächlich von der durchschnittlichen Strukturgröße beeinflusst wird. Das ZBP' für die jeweiligen Sequenzen beträgt 0,077 (LABS 44) 0,071 (LABS 45) und 0,051 (Barker-13 (M1)).

Die Filterdynamik kann für den Resonanzfall und für enge Geschwindigkeitsverteilungen (Peak-Breite auf der Geschwindigkeitsachse bei $R_v[0]$) durch das NKO Filter weiter verbessert werden. Bei reinen Zählantworten können die Zählraten durch den Einsatz dieser Filter stark erhöht und die Falscherkennungsrate minimiert werden (Kap. 3.6.3). In Abb. 4.4 sind $ISLR$ und $PSLR$ der Ausgangssignale des Balancierten Filters und des NKO Filters ($3N$) für LABS der Lfd. Nr. 1 bis 105 (Länge $N = 2$ bis $N = 64$) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Einsatz eines NKO Filters die Dynamik der Messung durch aktive Unterdrückung der Signalnebenkeulen erhöht. Somit lassen sich auch höhere maximale Zählraten realisieren. Insbesondere die LABS mit Lfd. Nr. 46, 47, 60 und 74 stechen aus dem mittleren Bereich des Spektrums hervor.

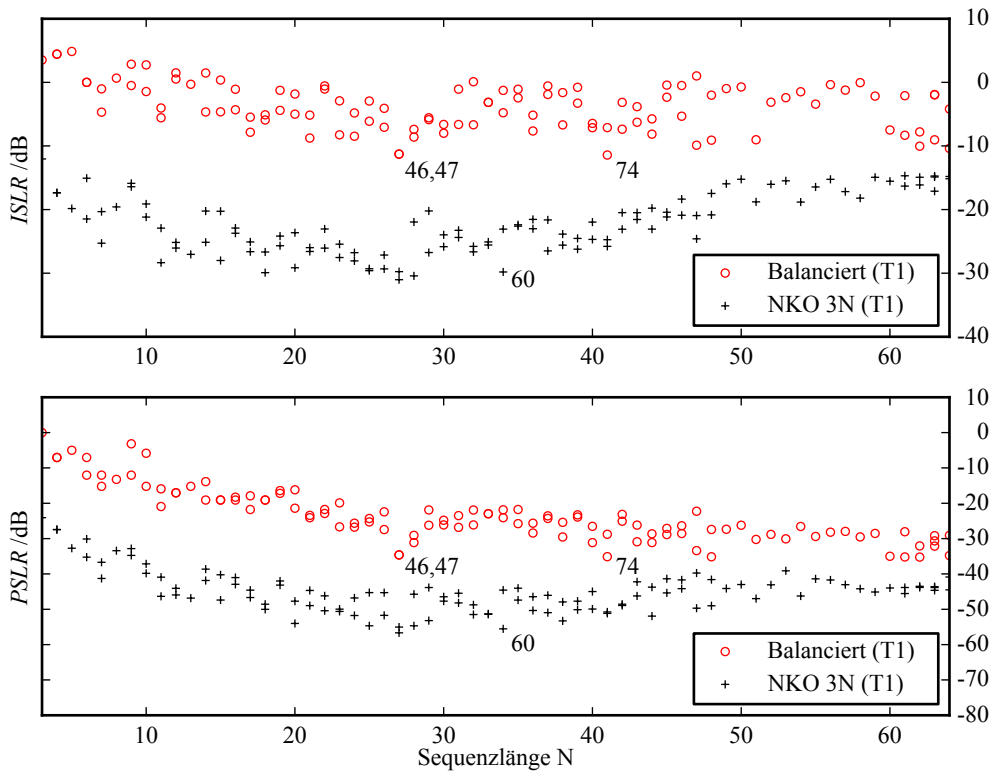


Abb. 4.4: $ISLR$ und $PSLR$ der Ausgangssignale des Balancierten und des NKO Filters für T1-transformierte LABS mit den Lfd. Nr. 1 bis 105. Für den Resonanzfall bzw. enge Geschwindigkeitsverteilungen kann durch das NKO Filter die Signaldynamik für jede Sequenz erhöht werden. Insbesondere stechen die LABS mit Lfd. Nr. 46, 47, 60 und 74 aus dem mittleren Teil des Spektrums hervor und sind besonders geeignet, um bei engen Geschwindigkeitsverteilungen und hohen Partikeldichten hohe Trennschärfe zu erzielen.

4.3 Breite Geschwindigkeitsverteilungen

Breite Geschwindigkeitsverteilungen liegen zumeist dann vor, wenn sich mehrere Zelltypen im Probenstrom befinden und sich bei spezifischen Gleichgewichtsgeschwindigkeiten anordnen. Zur Auflösung einzelner Populationen ist es einerseits wünschenswert eine Modulationssequenz mit hohem Auflösungsvermögen im Geschwindigkeitsspektrum zu verwenden. Zum anderen sollten Signalnebenkeulen auf nicht-resonanten Kanälen möglichst gering sein. Vor allem letzterer Aspekt wird bei der Suche von LABS für RADAR-Anwendungen nicht berücksichtigt, da dort nur schmalbandige Signale zur Übertragung und Geschwindigkeitsermittlung genutzt werden. Wie in vorherigem Abschnitt gezeigt, kann das Auflösungsvermögen im Geschwindigkeitsbereich maßgeblich über die Sequenzlänge N und das ZBP' gesteuert werden, wobei physikalische Randbedingungen wie Zellgrößen und Länge der Detektionszone berücksichtigt werden müssen.

Beispielsweise besitzen zirkulierende Tumorzellen (engl. *circulating tumor cells, CTC*) Größen bis zu $40\mu\text{m}$. Bei einer Detektionszone, die eine Länge von ca. 1mm aufweist, entspricht diese Länge dem 25-fachen der Zellgröße. Da die minimale physikalische Strukturgröße der Maske einen Wert von $40\mu\text{m}$ nicht unterschreiten darf, ist die Sequenzlänge auf einen Wert von etwa $N = 25$ beschränkt. Diese Länge gilt jedoch nur für solche Sequenzen, die mit 1 beginnen und auf 1 enden und somit den gesamten Ausleuchtungs- bzw. Detektionsbereich ausnutzen. Besitzt eine Sequenz eine oder mehrere Nullen am Anfang oder am Ende, so kann die Sequenz auch länger sein.

Ausgehend von diesem Beispiel wird in dieser Arbeit gezielt nach Sequenzen der Länge $N = 26$ gesucht, die möglichst geringe Signalnebenkeulen auf nicht-resonanten Geschwindigkeitskanälen aufweisen. Die Wahl dieser Länge hat den Vorteil, dass ein direkter Vergleich zur Barker-13 (M1) Sequenz gezogen werden kann, die besonders gute Eigenschaften auf dem resonanten Geschwindigkeitskanal zeigt. Außerdem stehen mit LABS 44 und LABS 45 zwei weitere Sequenzen zur Verfügung, die bereits in vorhergehendem Abschnitt untersucht wurden.

Die Suche nach einer geeigneten Sequenz verlangt zunächst definierte Suchparameter. Da sich der Merit-Faktor bzw. das *ISLR* als besonders geeignete Suchparameter für den Resonanzfall erweisen, wird das *ISLR* in dieser Arbeit auf den nicht-resonanten Anwendungsfall erweitert und im Folgenden mit *2DISLR*

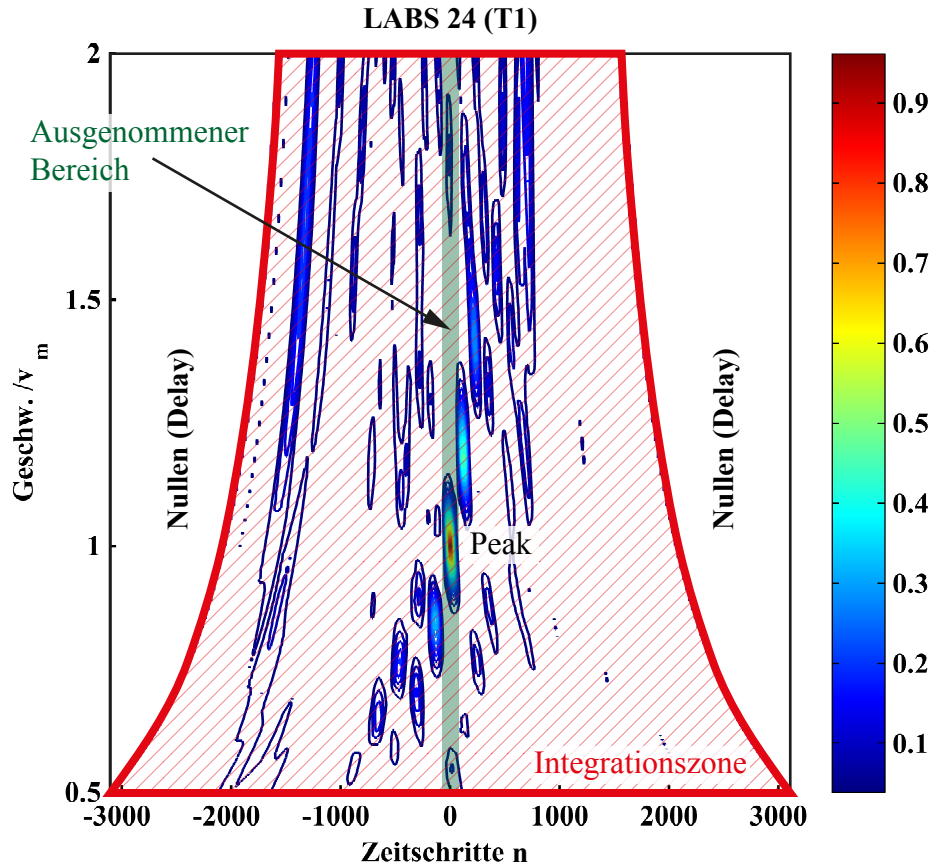


Abb. 4.5: Quadrierte Korrelationsmatrix $R_v^2[n]$ (Balanciertes Filter) von LABS 45 der Länge $N = 26$ (Konturplot). Rot schraffiert ist der Bereich, in dem die Integration zur Bestimmung des $ISLR_{v_i}$ und des $2DISLR$ stattfindet. Außerdem wird anhand des höchsten Peaks aus diesem Bereich das $2DPSLR$ bestimmt. Grün schraffiert ist der Bereich $|n| < n_{\min}$, der von der Integration ausgenommen wird, da sich in diesem Korridor der Hauptpeak befindet und per Definition nicht zum $ISLR_{v_i}$ oder $2DISLR$ beiträgt. n_{\min} ist für dieses Beispiel zu 40 gesetzt. Neben dem Hauptpeak sind deutliche Signalnebenkeulen auf nicht-resonanten Geschwindigkeitskanälen zu erkennen.

bezeichnet. Dabei muss berücksichtigt werden, dass der eigentliche Signalpeak in der Korrelationsmatrix $R_\nu[n]$ je nach Sequenz eine gewisse Ausdehnung hat und mathematisch nicht scharf erfasst werden kann (Abb. 4.7). Zur Berechnung des $2DISLR$ wird daher ein Bereich auf der Zeitachse um den Hauptpeak ausgenommen, der auf der Zeitachse gerade der doppelten Halbwertsbreite des Hauptpeaks entspricht. In diesem Bereich muss ohnehin davon ausgegangen werden, dass der resonante Kanal das beste Korrelationsergebnis liefert und somit eindeutig identifiziert werden kann. In Abhängigkeit der gewählten Auflösung n_{\min} (Samples bei ν_{max}) beträgt die gewählte Breite des ausgenommenen Bereichs hier $2n_{\min} + 1$.

Das $2DISLR$ wird unter Berücksichtigung des ausgenommenen Bereichs definiert zu:

$$2DISLR = \frac{1}{K} \sum_{i=0}^{K-1} \sum_{|n| > n_{\min}} \frac{1}{2N(\frac{2\nu_m}{\nu_i} n_{\min}) - 1 - (2n_{\min} + 1)} R_{\nu_i}^2[n] \quad (144)$$

$$= \frac{1}{K} \sum_{i=0}^{K-1} \frac{1}{2N(\frac{2\nu_m}{\nu_i} n_{\min}) - 2n_{\min} - 2} \sum_{|n| > n_{\min}} R_{\nu_i}^2[n], \quad (145)$$

wobei $\nu_i \in [0, 5\nu_m, 2\nu_m]$.

Analog dazu wird das sogenannte $ISLR_{\nu_i}$ definiert, das das $ISLR$ auf einem bestimmten Geschwindigkeitskanal ν_i beschreibt und ebenfalls die Breite des Peaks (Zeitachse) zur Berechnung ausnimmt:

$$ISLR_{\nu_i} = \frac{1}{2N(\frac{2\nu_m}{\nu_i} n_{\min}) - 2n_{\min} - 2} \sum_{|n| > n_{\min}} R_{\nu_i}^2[n]. \quad (146)$$

Gleichsam berechnet sich das $2DPSLR$ über:

$$2DPSLR = \max_{|n| > n_{\min}} R_\nu^2[n]. \quad (147)$$

Der Normierungsfaktor

$$\frac{1}{2N(\frac{2\nu_m}{\nu_i} n_{\min}) - 2n_{\min} - 2} \quad (148)$$

in Gl. 145 und Gl. 146 berücksichtigt, dass nur solche Einträge der Korrelationsmatrix $R_{\nu_i}[n]$ normiert werden, die für den jeweiligen Geschwindigkeitskanal aus dem Referenzsignal resultieren. Würde man sämtliche Stützstellen der Korrelationsmatrix zur Normierung heranziehen, so würden auch alle Nullen miteinbezogen, die rein der zeitlichen Synchronisation dienen (siehe Abb. 4.7 und 4.5). Der Normierungsfaktor $1/K$ berücksichtigt zudem die Zahl der Geschwindigkeitskanäle, über die summiert wird und eliminiert die Abhängigkeit von der Geschwindigkeitsauflösung, die durch n_{\min} vorgegeben wird.

Anhand des $2DPSLR$, des $ISLR_{\nu_i}$ und $2DISLR$ können schließlich vorhandene Sequenzen bezüglich ihrer Nebenkeulen auf nicht-resonanten Geschwindigkeitskanälen bewertet werden. Außerdem kann gezielt nach Sequenzen gesucht werden, die für die Anwendung bessere Charakteristika als die bislang bekannten, transformierte Sequenzen aus der RADAR-Technik aufweisen. In Tab. 3 findet sich eine Gegenüberstellung entsprechender Charakteristika für verschiedener Sequenzen der Längen $N = 26$, wobei alle Werte durch Balanciertes Filtern ermittelt wurden. LABS 44 (a) und LABS 45 (b) stammen dabei

aus Anh. A (T1), während B13Man die Barker-13 (M1) Sequenz ist. Zudem sind drei weitere Sequenzen gelistet, die sich nach einer vollständigen Suche (*engl. exhaustive search*) bei $N = 26$ neben der Barker-13 (M1) als die besten Sequenzen bezüglich des $2DISLR$ herauskristallisiert haben.

Diese Sequenzen lauten:

$$7687078 = 1974AB8 \quad (149)$$

$$7771820 = 0D5A5B8 \quad (150)$$

$$36655443 = 32A2BD1. \quad (151)$$

Der direkte Vergleich zeigt, dass LABS 44 und LABS 45 sowohl ein schlechteres $2DISLR$, als auch ein schlechteres $2DPSLR$ als alle übrigen Sequenzen aufweisen. Hinsichtlich des $2DISLR$ zeigt die Barker-13 (M1) Sequenz das beste Resultat. Nach Vergleich der $2DPSLR$ -Werte geben jedoch die speziell gesuchten Sequenzen (d)-(f) ein besseres Bild ab. Bezüglich der Geschwindigkeitsauflösung (ZBP') zeigt die Barker-13 (M1) Sequenz zusammen mit Sequenz (f) den besten Wert. Aufgrund des wesentlich besseren $2DPSLR$ und des geringfügigen Unterschieds der $2DISLR$ -Werte, ist Sequenz (f) bei den gewählten Bewertungskriterien schlussendlich die beste Sequenz für breite Geschwindigkeitsverteilungen.

Sequenz	$PSLR$	$ISLR$	$2DPSLR$	$2DISLR$	ZBP'
(a) LABS 44 (T1)	0,0425	0,4437	0,4210	0,0148	0,0769
(b) LABS 45 (T1)	0,0756	0,6250	0,4767	0,0175	0,0769
(c) B13Man	0,2899	0,6450	0,3122	0,0093	0,0553
(d) 7687078	0,0947	0,9053	0,2003	0,0099	0,0710
(e) 7771820	0,0947	0,8580	0,1534	0,0090	0,0588
(f) 36655443	0,0947	1,1893	0,1534	0,0101	0,0553

Tab. 3: Vergleich verschiedener Sequenzen der Länge $N = 26$. Alle Werte sind linear in willkürlichen Einheiten angegeben.

Die Korrelationsmatrizen der Sequenzen in Tab. 3 (a)-(d) sind in den Abbildungen 4.6, 4.7, 4.8 und 4.9 als 3D-Plots dargestellt. Vor allem für LABS 44 (T1) und LABS 45 (T1) sind die ausgeprägten Signalnebenkeulen auf den nicht-resonanten Geschwindigkeitskanälen eindeutig zu erkennen.

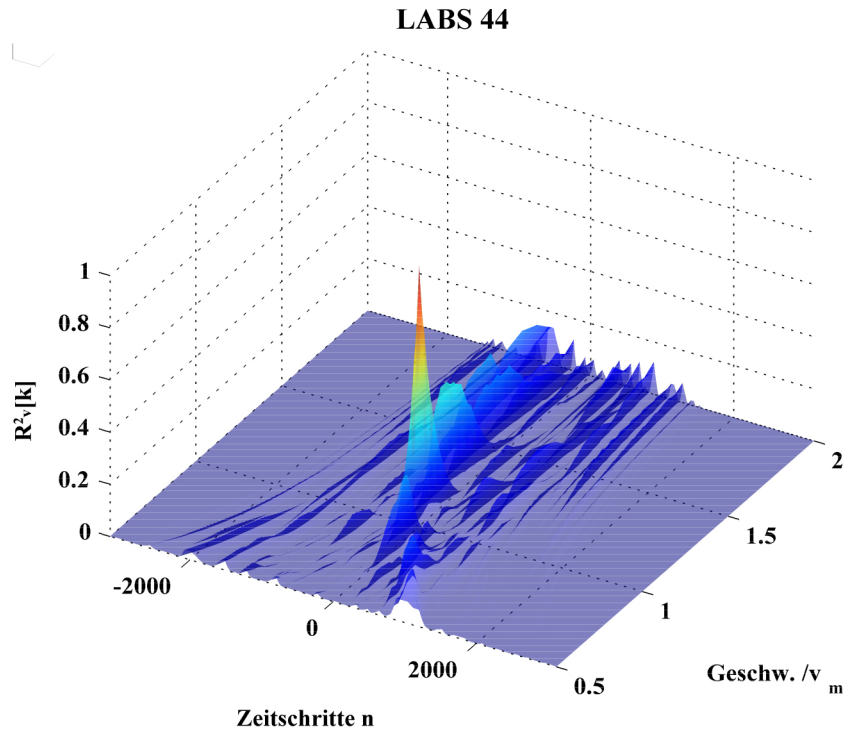


Abb. 4.6: Quadrierte Korrelationsmatrix $R_v^2[k]$ (Balanciertes Filter) von LABS 44 der Länge $N = 26$ (perspektivischer 3D-Plot) mit $n_{\min} = 40$.

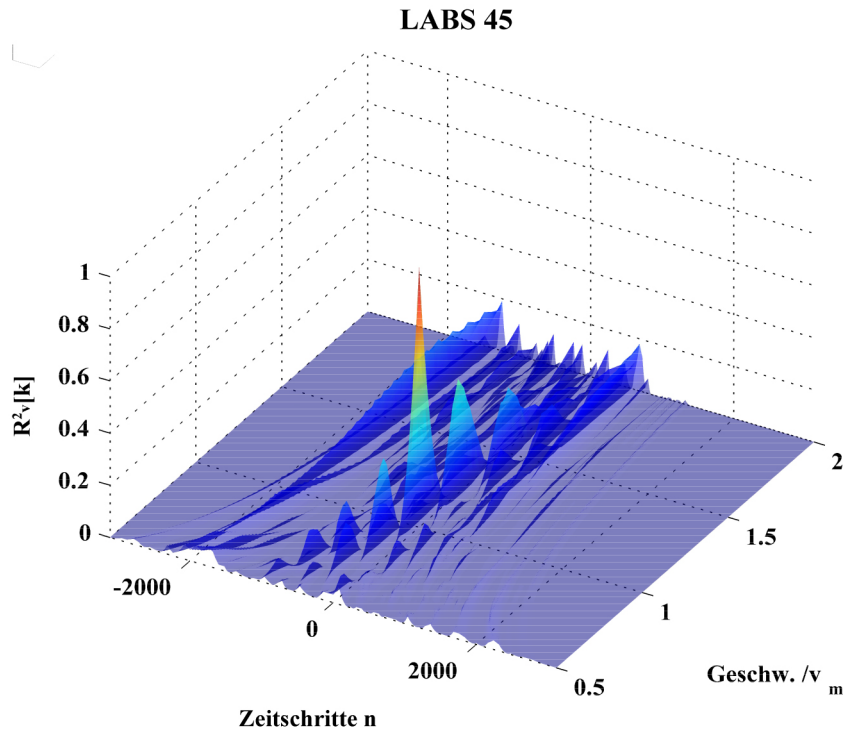


Abb. 4.7: Quadrierte Korrelationsmatrix $R_v^2[k]$ (Balanciertes Filter) von LABS 45 der Länge $N = 26$ (perspektivischer 3D-Plot) mit $n_{\min} = 40$.

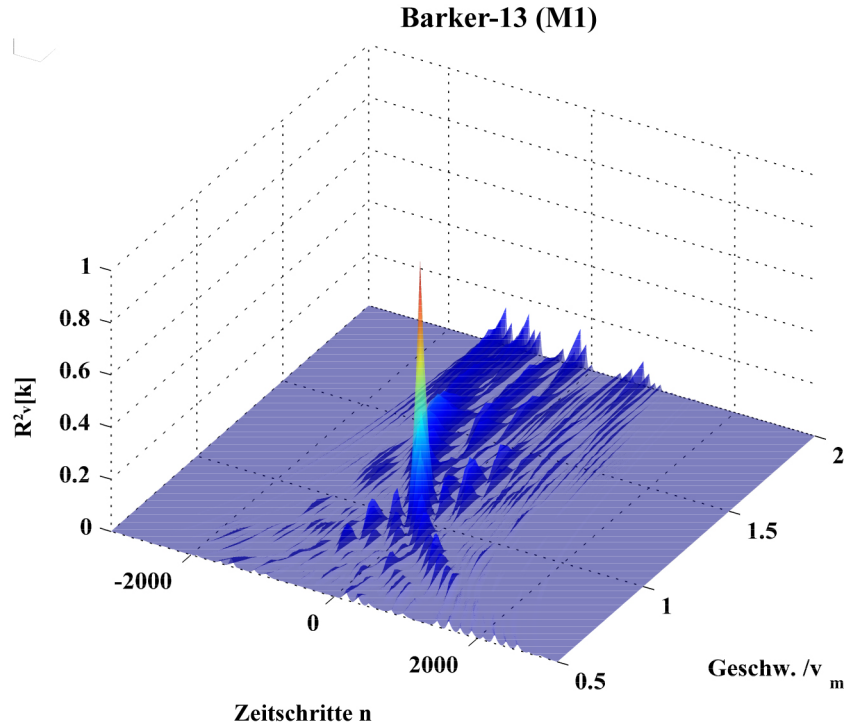


Abb. 4.8: Quadrierte Korrelationsmatrix $R_v^2[k]$ (Balanciertes Filter) von Barker-13 (M1) der Länge $N = 26$ (perspektivischer 3D-Plot) mit $n_{\min} = 40$.

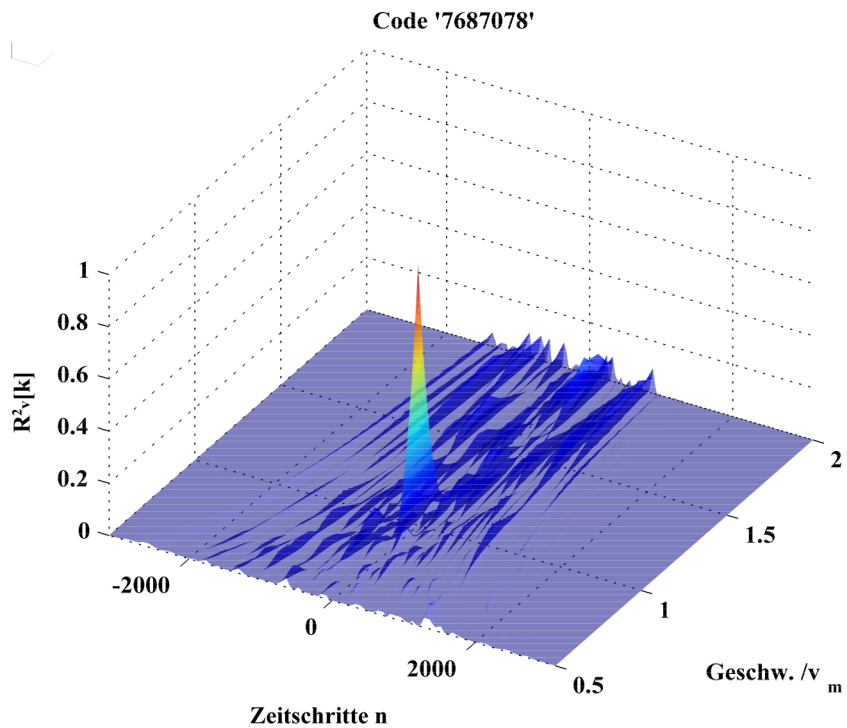


Abb. 4.9: Quadrierte Korrelationsmatrix $R_v^2[k]$ (Balanciertes Filter) von Sequenz '7687078' (siehe Tab. 3) der Länge $N = 26$ (perspektivischer 3D-Plot) mit $n_{\min} = 40$.

Zusätzlich zum Balancierten Filter kann das Verhalten des jeweiligen NKO Filters in die Bewertung mit einbezogen werden. Die Haupteigenschaft des NKO Filters liegt darin, das $ISLR$ des resonanten Geschwindigkeitskanals zu optimieren. Die Frage, die sich hierbei stellt, ist, inwiefern das $ISLR$ auf anderen (nicht-resonanten) Geschwindigkeitskanälen beeinflusst wird. Dazu werden alle $ISLR_{v_i}$ -Werte für alle Sequenzen aus Tab. 3 über das gesamte Geschwindigkeitsspektrum hinweg verglichen (Abb. 4.10). Da die Korrelationsmatrix durch die Länge des NKO Filters deutlich größer ist, als diejenige des Balancierten Filters, muss für einen direkten Vergleich beider Korrelationsmatrizen die gleiche Normierung gewählt werden, um eine Bevorzugung des NKO Filters durch die äußerst geringen Signalamplituden im Randbereich (Zeitachse) zu vermeiden. Daher wird für beide Filtermethoden der gleiche Integrationsbereich um die Peak-Position gewählt und entspricht dem in Abb. 4.5.

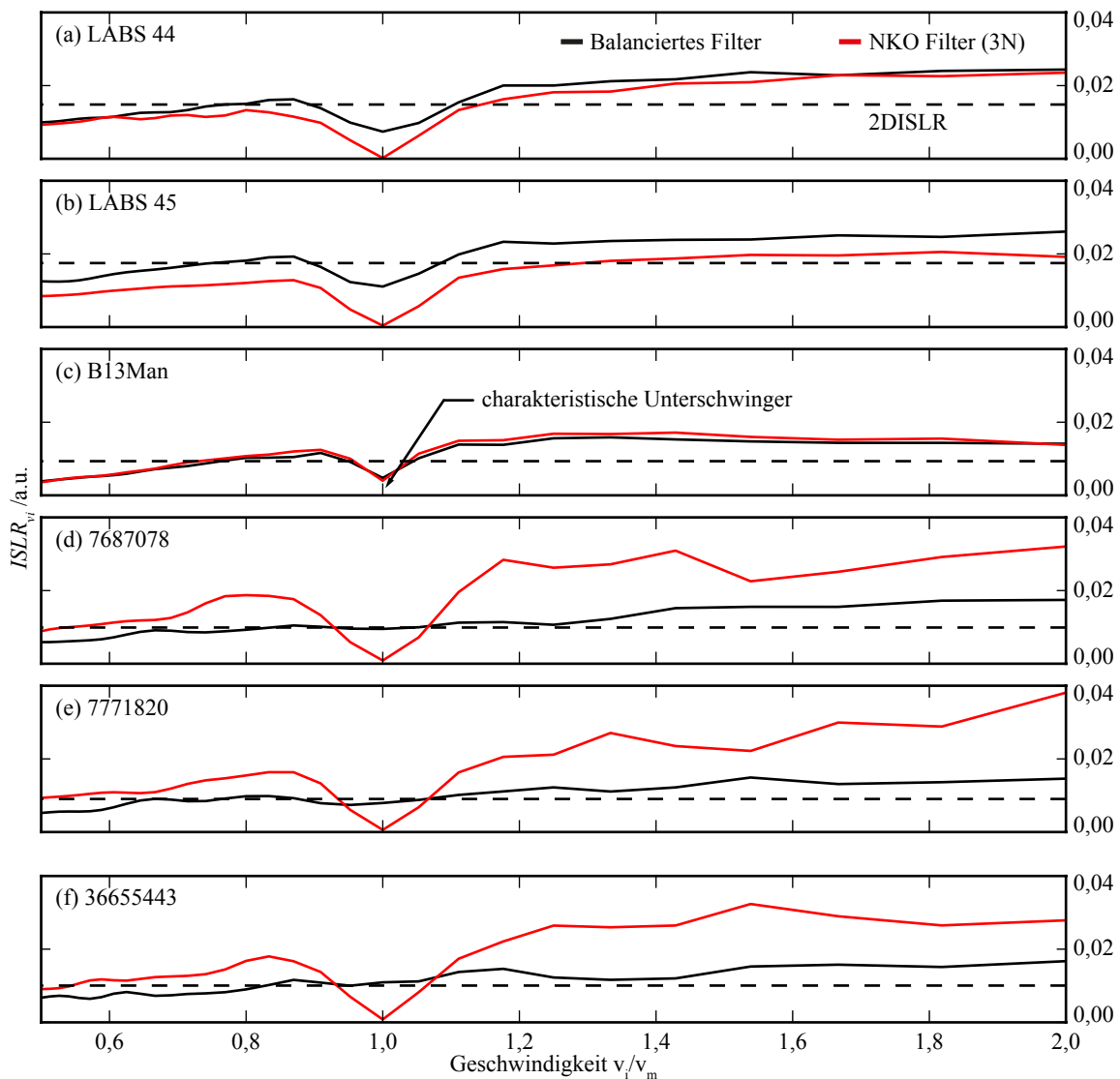


Abb. 4.10: $ISLR_{v_i}$ -Werte für verschiedene Sequenzen der Länge $N = 26$. Neben dem Verhalten des Balancierten Filters (schwarz) ist auch das Verhalten des NKO Filters (rot) gezeigt. Es lässt sich erkennen, dass das NKO Filter immer eine Verbesserung des $ISLR$ auf dem resonanten Geschwindigkeitskanal bewirkt. Das NKO Filter kann bei bestimmten Sequenzen zu einer Verbesserung der nicht-resonanten $ISLR_{v_i}$ -Werte führen (a), (b). Bei Sequenzen, die hinsichtlich eines geringen $2DISLR$ gesucht wurden, führt das NKO Filter zu einer drastischen Verschlechterung des $ISLR_{v_i}$ (e),(f). Bei der Barker-13 (M1) Sequenz in (c) ist zwischen Balanciertem Filter und NKO Filter kaum ein Unterschied zu erkennen.

In Abb. 4.10 ist deutlich zu erkennen, dass das NKO Filter (rot) für LABS 44 und LABS 45 für den resonanten Geschwindigkeitskanal wie auch über das gesamte Geschwindigkeitsspektrum eine eindeutige Verbesserung gegenüber dem Balanciertem Filter (schwarz) bringt. Für die Barker-13 (M1) Sequenz kommt ein konstruiertes NKO Filter (Gl. 126) zum Einsatz. Hier ist zu beobachten, dass der resonante Geschwindigkeitskanal insgesamt ein schlechteres *ISLR* aufweist als alle anderen Sequenzen. Dies ist den charakteristischen Unterschwinger um den Haupt-Peak geschuldet, die durch die Manchester-Transformation zustande kommen (siehe Abb. 3.11). Insgesamt verhält sich das NKO Filter bei dieser Sequenz etwas schlechter als das Balancierte Filter und zeigt eine geringfügige Verbesserung auf dem resonanten Geschwindigkeitskanal.

Für die Sequenzen in Abb. 4.10 (d)-(f) sind die $ISLR_{v_i}$ -Werte des Balancierten Filters über das gesamte Geschwindigkeitsspektrum hinweg flach ausgeprägt, sodass hier mit gleichmäßigen und geringen nicht-resonanten Signalnebenkeulen auf allen Geschwindigkeitskanälen gerechnet werden kann. Wendet man jedoch das NKO Filter auf diese Sequenzen an, so ist zwar eine starke Verbesserung des *ISLR* auf dem resonanten Kanal zu beobachten. Auf den nicht-resonanten Kanälen entstehen dann jedoch erhebliche Signalnebenkeulen. Anhand des *2DISLR*, das in allen Diagrammen in Abb. 4.10 als gestrichelte Linie eingezeichnet ist, zeigt sich, dass die mittlere Amplitude nicht-resonanter Signalnebenkeulen für speziell gesuchte Sequenzen deutlich unter denjenigen von anderen Sequenzen (LABS 44 und LABS 45) liegen.

Für die Verwendung des NKO Filters lässt sich zusammenfassend feststellen, dass es eine Verbesserung des *2DISLR* für bestimmte Sequenzen (hier LABS 44 und LABS 45) durchaus gelingen kann. Für die Barker-13 (M1) Sequenz bringt das konstruierte NKO Filter geringfügige Nachteile bezüglich des *2DISLR* und erfordert für seine Implementierung unnötigen Hardware-Aufwand. Sequenzen, die im Rahmen der Balancierten Filterung auf das *2DISLR* hin optimiert sind, verhalten sich bei Anwendung des NKO Filters auf nicht-resonanten bezüglich ihrer Signalnebenkeulen deutlich schlechter als alle anderen Sequenzen. Obwohl eine Verbesserung des *ISLR* des resonanten Geschwindigkeitskanals eintritt, ist für enge Geschwindigkeitsverteilungen die Verwendung einer anderen Sequenz (z.B. Barker-13 (M1)) zu empfehlen.

5 Versuchsaufbauten

Im Laufe dieser Arbeit sind zwei Versuchsaufbauten entstanden, die stetig angepasst, erweitert und umgebaut wurden. In diesem Kapitel werden beide Aufbauten nach dem letzten Entwicklungsstand beschrieben und es wird darauf verzichtet, den gesamten Entwicklungsprozess darzulegen. Die Messungen, die an den Aufbauten durchgeführt wurden und im nächsten Kapitel eingehend beschrieben werden, sind in verschiedenen Zwischenstufen der Entwicklung entstanden. Die zu diesen Zeitpunkten erfassten Signale unterscheiden sich jedoch nur geringfügig von den Signalen aktueller Aufbauten, sodass die gewonnenen Ergebnisse vom Status der Entwicklung weitgehend unabhängig sind. Während das Kamera-Setup dazu dient, die prinzipielle Funktion multipler Detektionspfade (Kap. 2) zu demonstrieren, wurde der Haupt-Fokus auf das Einzel-Detektor-Setup gelegt, da es als Detektionseinheit zentraler Baustein des CTC-Projekts am Fraunhofer ICT-IMM ist.

5.1 Einzel-Detektor-Setup

In diesem Abschnitt wird auf das Einzel-Detektor-Setup eingegangen, das nach dem Prinzip der direkten Modulation der Anregung (Kap. 2.2, Abb. 2.2) arbeitet. Dieses Prinzip hat den Vorteil, dass es sehr robust gegenüber unbeständigen Umwelteinflüssen und Vibrationen ist. Nach einmaliger Justage ist kein weiterer Wartungsaufwand notwendig, da die mechanische Interaktion mit dem System (z.B. Wechseln des Chips) einseitig erfolgt und somit nicht in die Optik eingegriffen werden muss. Dieser Vorteil wird mit einer geringeren Fluoreszenzausbeute erkauft, da die Detektion des Fluoreszenzlichts durch die Modulationsmaske hindurch vorgenommen wird (Kap. 2.3).

Bevor der Gesamtaufbau des Systems vorgestellt wird, werden zunächst das Chipdesign und Chipherstellung, als auch die Maskenherstellung erläutert.

5.1.1 Chipdesign und Chipfertigung

Das Chipdesign folgt einem Standarddesign, wie es üblicherweise für die Elektrophorese verwendet wird. Der Chip, der für diese Arbeit aus PMMA gefertigt wird, verfügt insgesamt über drei fluidische Einlässe und einen Auslass, wobei die senkrechten Einlässe zum Hauptkanal zur Injektion des Hüllstroms dienen (Abb. 5.1). Der Probeneinlass befindet sich im Gegensatz zur Elektrophorese in der Verlängerung des Hauptkanals. Über die Flussraten lässt sich die hydrodynamische Fokussierung einstellen. Die Anschlüsse sind HPLC-konform (*engl. für high performance liquid chromatography*) gewählt, sodass Schläuche über entsprechende Fittings sofort angeschlossen werden können.

In Abb. 5.1 sind neben der schematischen Darstellung des Chips (Mitte) auch eine REM (Abk. für Raster-Elektronen-Mikroskop) Aufnahme des Chipquerschnitts zu sehen (unten links). Die Kanalabmaße betragen bei diesem Beispiel $486\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ und wurden im Laufe der Chipentwicklung verkleinert auf ca. $480\mu\text{m} \times 18\mu\text{m}$. Dadurch ergibt sich ein stärkerer Gradient des Flussprofils, der kleinere Zellen oder Partikel ($< 10\mu\text{m}$) schneller in die Gleichgewichtspositionen ihrer spezifischen Geschwindigkeiten zwingt. Durch die geringere Tiefe lassen sich die Chips in einem Heißprägeprozess außerdem besser fertigen, da Unterätzungen des Prägestempels (Imperfektionen) auf Siliziumbasis weniger von Bedeutung sind.

Für größere Zellen, wie z.B. Tumorzellen (CTC Projekt), müssen jedoch tiefere Kanäle realisiert werden. Dies gelingt für Prototypen und Kleinserien am besten per CNC-Fräsen der Kanäle und der Chips. Zu diesem Zweck wurde ein einschneidiger Diamantfräser mit einem Durchmesser von $500\mu\text{m}$ verwendet. Verglichen mit geprägten Chips, sind bei gefrästen Strukturen jedoch immer Frässpuren auf dem Kanalboden erkennbar und können das fluidische Verhalten beeinflussen.

Die Außenabmessung der Chips ist, unabhängig vom Kanalquerschnitt, immer gleich und beträgt $89,8\text{mm} \times 21,8\text{mm} \times 5\text{mm}$ (Breite X Höhe X Tiefe). Detektiert werden die Zellen ca. 5 cm hinter dem

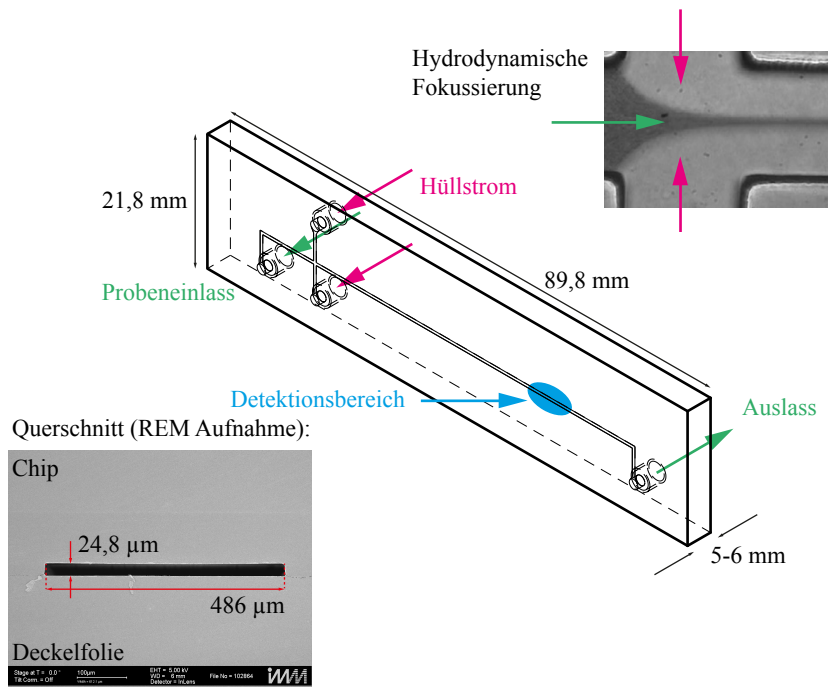


Abb. 5.1: Chipdesign des verwendeten mikrofluidischen Chips. Der Chip verfügt über drei Einlässe und einen Auslass. Oben rechts: Über die senkrechten Zuführungen beim Probeneinlass kann die hydrodynamische Fokussierung eingestellt werden (entnommen aus [11]). Unten links: Beispielhaft dargestellt ist eine REM Aufnahme eines Chips mit einem Kanalquerschnitt von ca. $486\,\mu\text{m} \times 25\,\mu\text{m}$, der eine nahezu rechteckige Ausprägung zeigt.

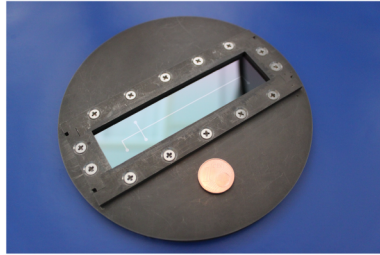
Kreuzungspunkt der Einlässe. Durch diese Distanz haben die Zellen erfahrungsgemäß eine ausreichende Laufstrecke zurückgelegt, um sich bei ihrer spezifischen Gleichgewichtsgeschwindigkeit anzuordnen.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, ist es wichtig, dass sich der Kanalquerschnitt nicht oder nur geringfügig ändert. Dies muss sowohl über die gesamte Kanallänge eines einzelnen Chips gewährleistet sein, als auch für verschiedene Chips gleicher Bauart. Der Kanalquerschnitt wird einerseits durch die Bearbeitung des Substrats beeinflusst und andererseits durch die Deckelung (Bonding). Während die Kanalstruktur für Prototypen und Kleinserien durch ein Heißprägeverfahren reproduzierbar auf das Chipsubstrat übertragen werden kann, stellt vor allem das Bonding eine große Herausforderung in der Chipfertigung dar. Denn bei Strukturgrößen von ca. $20\,\mu\text{m}$ können gängige Verfahren wie Laserschweißen, Lösemittelbonden oder Laminieren (Kleben) nicht angewandt werden, ohne die Kanalstruktur zu beeinflussen oder gar zu zerstören.

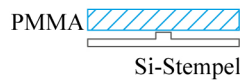
Trotzdem muss das Bonding eine Dichtheit des Kanals für hohe Drücke gewährleisten und muss gleichzeitig von optischer Qualität sein, sodass das Fluoreszenzlicht der Zellen unverfälscht detektiert werden kann. Um diesen Anforderungen zu genügen, wurde für diese und eine verwandte Arbeit (Christian Sommer) ein Bonding-Verfahren nach dem Prinzip der UV-Aktivierung von Polymeren entwickelt. An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Peter Spang und Christian Sommer, die das Verfahren maßgeblich entwickelt und das angestrebte Chipdesign somit ermöglicht haben.

Der gesamte Herstellungsprozess des Chips ist in Abb. 5.2 illustriert. Für das Prägeverfahren wird zunächst eine Prägeform entwickelt (Abb. 5.2, oben links), die höchst planare Oberflächen aufweist, um eine gleichmäßige Auflagefläche des verwendeten Prägestempels auf Siliziumbasis zu gewährleisten. Geringste Unebenheiten wie Dellen, Späne oder Staub können bereits dazu führen, dass der spröde Siliziumstempel beim Prägen reißt und somit zerstört wird.

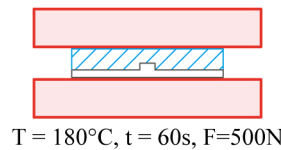
Formeinsatz mit Silizium Stempel



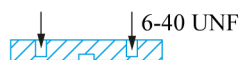
1. Einlegen des PMMA Rohlings



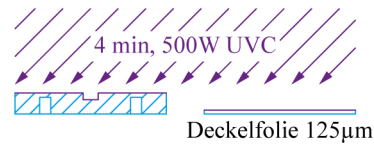
2. Heißprägen



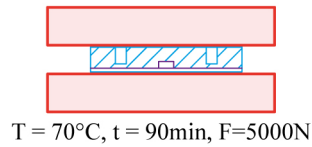
3. Herstellen der HPLC Anschlüsse



4. UV-Aktivierung der Oberflächen



5. Bonden in der Heißpräge



Fertiger PMMA Chip

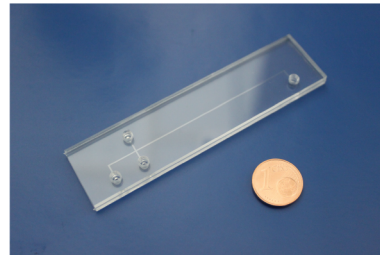


Abb. 5.2: Chipherstellung im Heißprägeverfahren. Der Prägestempel auf Siliziumbasis befindet sich in einer plan geschliffenen Prägeform aus Stahl. Nachdem ein PMMA Rohling mit einer Dicke von mind. 6 mm in die Form eingelegt wurde (1), wird die Form zusammen mit dem Rohling in die Heißpräge eingelegt (2). Bei einer Temperatur von 180 °C wird der Rohling dann 60 s bei einer Kraft von 500 N geprägt. Anschließend wird der Prägewulst abgefräst und die fluidischen HPLC-Anschlüsse hergestellt (3). Chip und Deckelfolie (125 µm) werden dann durch UVC-Bestrahlung (500 W) 4 min lang aktiviert und somit die Glasübergangstemperatur oberflächlich gesenkt (4). Dadurch können Chip und Deckelfolie anschließend in der Heißpräge bei 70 °C, einer Haltezeit von 60 min und einer Kraft von 5000 N verschmolzen werden, ohne die Kanalstruktur zu zerstören (5). Der fertige Chip besitzt schließlich eine Oberfläche von nahezu optischer Qualität.

Der Prägestempel wird nach bekannten Fertigungsmethoden in der Siliziumtechnik hergestellt und besitzt die 'negative' Form der eigentlichen Kanalstruktur, die dann unter Hitze in das PMMA Substrat abgeformt wird (Abb. 5.2 (2)). Dazu wird die Heißpräge bei einer Temperatur von 180 °C bei einer konstanten Kraft von 500 N 60 s betrieben. Anschließend wird die Heißpräge auf ca. 60 °C herabgekühlt, bevor die Prägeform entnommen und der Chip entformt werden kann.

Im nächsten Arbeitsschritt wird der Chip mechanisch bearbeitet, indem überschüssiges PMMA (Prägewulst) abgefräst und die HPLC-Konnektoren hergestellt werden (Abb. 5.2 (3)).

Für den Bonding-Prozess muss zunächst eine entsprechende Deckelfolie zugeschnitten werden (idealerweise per Laser), wobei die Folie aus optischen Gründen so dünn wie möglich gewählt werden sollte. Aus mechnischen und Verarbeitungsgründen sollte die Folie jedoch eine gewisse Dicke aufweisen, sodass letztendlich eine Folienstärke von 125 µm gewählt wurde. Vor dem eigentlichen Bonden müssen sowohl die Oberfläche des Chips, als auch der der Deckelfolie mit UV Licht 'aktiviert' werden (Abb. 5.2 (4)). Bei der vierminütigen Aktivierung mit UVC Licht von 500 W, in einem Abstand von ca. 20 cm von der UV-Lampe, werden die Polymerstrukturen (Moleküle) bis zu einer Tiefe von wenigen 100 nm aufgebrochen. Dadurch wird die sogenannte Glasübergangstemperatur des Polymers an der Oberfläche gesenkt. Nach erfolgter Aktivierung werden Chip und Deckelfolie so aufeinandergebracht, dass die aktivierten Oberflächen aufeinander liegen. Dieses sogenannte 'Sandwich' wird schließlich erneut in die Heißpräge

eingelegt, in der die Oberflächen bei einer Temperatur von 70 °C und einer Haltezeit von 90 min verschmolzen werden (Abb. 5.2 (5)). Im Vergleich zum Prägeprozess reicht beim Bonden eine Haltekraft von 500 N gewählt werden, da kein Material verdrängt werden muss. Zudem werden zu große Materialspannungen durch geringeren Kraftaufwand vermieden. Geringere Kraft und Temperatur verhindern außerdem eine Schädigung der Kanalstruktur.

5.1.2 Maskenfertigung

Die Masken zur strukturierten Anregung (direkte Modulation der Anregung) wurden ebenfalls auf Siliziumbasis hergestellt. Gebräuchliche Silizium-Wafer, die vor Ort verarbeitet werden können, haben einen Durchmesser von 5 Zoll und eine Dicke von 625 μm . Da die Strukturgrößen der Schattenmaske im Bereich von 50 μm – 100 μm liegen, ergeben sich, bezogen auf die Wafer-Dicke, hohe Aspektverhältnisse. Aufgrund solch hoher Aspektverhältnisse können im Ätzprozess des Wafers starke Unterätzungen auftreten, die das gewünschte Ergebnis stark verfälschen. Aus diesem Grund werden die Masken in einem zweistufigen Prozess hergestellt (Abb. 5.3).

Dazu wird zunächst eine wannenförmige Vertiefung in die Substratoberfläche geätzt, die die effektive Dicke des Wafers in diesem Bereich auf ca. 50 μm reduziert (2). Im nächsten Schritt wird dann die eigentliche Struktur in diesem Bereich hergestellt (3). Da Silizium eine stark reflektierende Oberfläche besitzt, muss schließlich eine Anti-Reflex-Beschichtung aufgebracht werden, die die Reflexion und Streuung des

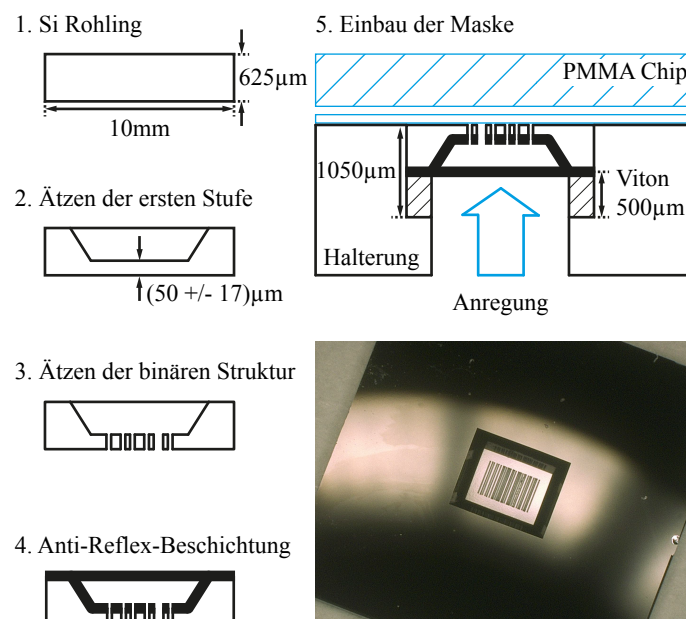


Abb. 5.3: Herstellung der Silizium-basierten Masken zur strukturierten Anregung. Gezeigt ist die Ferti-gung einer einzelnen Maske. Insgesamt können auf einem Standard-Silizium-Wafer (5 Zoll) 121 Masken parallel hergestellt werden. Im Fertigungsprozess muss zunächst eine wannenförmige Vertiefung geätzt werden, sodass die effektive Materialstärke des Siliziums von 625 μm auf etwa 50 μm reduziert wird (2). Bei Strukturgrößen zwischen 50 μm und 100 μm wird so gewährleistet, dass das Aspektverhältnis der Strukturen nicht zu groß ist und Unterätzungen vermieden werden. Nachdem die binäre Struktur in einem zweiten Schritt geätzt wurde (3), muss eine tiefschwarze Anti-Reflex-Beschichtung einseitig auf-gebracht werden (4), um Reflexionen des Anregungslichts zu unterdrücken. Diese Beschichtung (Firma Acktar) erfolgt gerichtet, sodass Öffnungen nicht verschlossen werden. Für den Einbau wird die Maske auf einer 500 μm dicken Scheibe aus Viton gelagert, um einen gleichmäßigen und definierten Anpress-druck zu gewährleisten und Scherkräfte zu vermeiden. Letztere können leicht zu einer Zerstörung der Maske führen.

Anregungslichts unterdrückt. Für die verwendeten Masken wird eine tiefschwarze Beschichtung der Firma Acktar verwendet, die einen Reflexionsgrad von typischerweise $< 3\%$ aufweist (4). Die Montage der Masken erfolgt in einer speziellen Chiphalterung, in die die Maske zusammen mit einer Zwischenscheibe aus Viton ($500\mu\text{m}$) eingelassen wird (5). Diese elastische Zwischenscheibe garantiert einen gleichmäßigen Anpressdruck des Chips auf der Maske und verhindert, dass Scherkräfte auftreten, die die Maske leicht zerstören können. Die gesamte Taschentiefe der Chiphalterung beträgt $1050\mu\text{m}$, sodass der Stapel aus Viton und Maske einen Überstand von $120\mu\text{m}$ besitzt. Da Viton ein Elastomer ist, wird dieser Überstand beim Einlegen des Chips komprimiert, während die Maske gleichzeitig fest in der Halterung fixiert wird.

Die Außenabmessungen einer Maske betragen $10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$, sodass auf einem Wafer 121 Masken gleichzeitig hergestellt und durch Sägen vereinzelt werden können. Die CAD Modelle für die Belichtungsmasken zur Mikrostrukturierung wurden für diese Arbeit mit dem freien Python-Paket 'PyDXF' gezeichnet.

5.1.3 Optischer Gesamtaufbau

Der optische Gesamtaufbau ähnelt dem Schema eines Epi-Fluoreszenzmikroskops (vgl. Kap. 2.1). Der Pfad des Anregungslichts sowie der optische Pfad zur Detektion des Fluoreszenzlichtes fallen dabei zusammen und befinden sich auf einer Seite des Chips (Abb. 5.4). Die Trennung des Anregungslichts vom Fluoreszenzlicht erfolgt über einen dichroitischen Strahlteiler (Typ: T455LP), der sich unmittelbar hinter dem Objektiv befindet. Zur besseren Unterdrückung des Anregungslichts befinden sich zwischen Strahlteiler und Detektor zwei zusätzliche Filter: Ein Interferenzfilter/Bandpassfilter (Typ: 510/80) zusammen mit einem unterstützenden Farbglass/Langpassfilter (Typ: LP475). Die langwelligen Anteile des Lasers mit einer Zentralwellenlänge von 448 nm werden im Pfad der Anregung zusätzlich durch einen Anregungsfilter (Typ: 436/20) unterdrückt, um die Dynamik des Filtersystems weiter zu verbessern. Die Bezeichnungen der Filter beziehen sich dabei alle auf das Angebot der Firma AHF Analysentechnik.

Bei dem verwendeten Multimode-Laser (40TE-445-1300-O04-A4-P-6) handelt es sich um eine Spezialanfertigung der Firma Schäfter + Kirchhoff. Der Laser (nominelle Leistung $1,6\text{ W}$) ist an eine Multimode-Faser mit $100\mu\text{m}$ Kerndurchmesser gekoppelt und besitzt aufgrund seiner Betriebsparameter und Kopplungsverlusten am Faserende eine maximale Ausgangsleistung von ca. $1,28\text{ W}$. Die numerische Apertur (NA) der Faser beträgt $0,22$.

Das verwendete Objektiv (Nikon Plan Apo λ 10X) besitzt eine $10\times$ Vergrößerung und ist darauf optimiert ins Unendliche abzubilden (*engl. infinity corrected*). Dies hat den Vorteil, dass die Beeinflussung des Strahlengangs durch Strahlteiler und Planoptiken minimiert wird. Das Objektiv besitzt außerdem eine relativ hohe Numerische Apertur ($NA = 0,45$) und einen Arbeitsabstand von 4 mm . Durch diesen verhältnismäßig großen Arbeitsabstand kann das Objektiv gut in Verbindung mit einer mechanischen Chip-Halterung verwendet werden. Der bestimmungsgemäße Einsatz des Objektivs erfolgt im sogenannten CFI60-System von Nikon, das unabhängig von der gewählten Vergrößerung (Objektiv) einen parfokalen Abstand von 60 mm aufweist. Alle Objektive aus dieser Serie sind auf eine Tubuslänge (Fokallänge der Tubuslinse) von $f_t = 200\text{ mm}$ ausgelegt, anhand derer sich die effektive Brennweite des Objektivs berechnen lässt. Sei $M_0 = 10$ die Vergrößerung des Objektivs und f_o die effektive Brennweite des Objektivs, dann gilt

$$M_0 = \frac{f_t}{f_o}. \quad (152)$$

Für das verwendete Objektiv lässt sich f_o damit berechnen zu 20 mm . Während die vordere Brennebene des Objektivs mit einem Arbeitsabstand von $4,0\text{ mm}$ klar vorgegeben ist, wird die hintere Brennebene

vom Hersteller nicht spezifiziert. Versuche haben jedoch gezeigt, dass sie in 5 – 10 mm Abstand vom hinteren Ende der Verschraubung im Gehäuse des Objektivs liegt.

Eine weitere wichtige Kenngröße des Objektivs ist das sogenannte Sichtfeld (*engl. field of view, FOV*), das sich über die Feldnummer (*engl. field number, FN*) und die Vergrößerung M_O berechnen lässt zu:

$$FOV = \frac{FN}{M_O}. \quad (153)$$

Laut Herstellerangabe variiert die Feldnummer je nach Objektiv in einem Bereich von 22 und 28 mm, sodass das Sichtfeld für das verwendete Objektiv in einem Bereich von 2,2 mm bis 2,8 mm liegt. Genauere Spezifikationen liegen für das verwendete Objektiv nicht vor, grobe Charakterisierungen zeigen jedoch, dass das Sichtfeld mindestens 2,5 mm beträgt.

In Anlehnung an das Sichtfeld kann die Größe der Detektionszone festgelegt werden. Für den hier geschilderten Aufbau wird die Maske und somit die Detektionszone auf eine Abmessung von $300 \times 1250 \mu\text{m}$ festgelegt. Die Höhe von $300 \mu\text{m}$ wird dabei kleiner als die Breite des Kanals ($500 \mu\text{m}$ gewählt, um Reflexionen an den Kanalkanten auszublenden). Durch den Hüllstrom fließen die Zellen ohnehin in der Kanalmitte. Die Maske besitzt in etwa die halbe Länge des eigentlichen Sichtfeldes des Objektivs, sodass Ausrichtefehler des Chips zur optischen Achse korrigiert werden können und somit eine homogene Ausleuchtung der Detektionszone gewährleistet wird.

Da die Maske weder radialsymmetrisch noch quadratisch ist, sollte der Strahl des Anregungslichts entsprechend der Geometrie der Maske nachempfunden werden, um möglichst hohe Lichtintensitäten zu erreichen. Dies wird für den optischen Aufbau in Abb. 5.4 durch zwei Teleskopsysteme mit insgesamt vier Linsen realisiert. Ausgangspunkte für die Auslegung des Anregungspfades sind dabei die gewünschte Spot-Größe, die effektive Brennweite des Objektivs und die Numerische Apertur der Faser.

Da das Anregungslicht kollimiert sein sollte, um eine möglichst homogene Ausleuchtung zu erzielen, bildet das Objektiv zusammen mit der letzten Linse vor dem Strahlenteiler (Linse mit Brennweite f_3) ein Teleskop, das den vorkollimierten Strahl auf die gewünschte Größe verkleinert. Das aus der Faser austretende Licht wird dazu in einem ersten Schritt durch eine Kollimationsoptik (Linse mit Brennweite f_1) kollimiert.

Bei den Linsen mit Brennweiten f_a und f_b handelt es sich um ein konvex/konkaves Zylinderlinsenpaar in Teleskopkonfiguration, das den Strahl nur in y-Richtung formt und somit für die elliptische Gestalt des Strahls verantwortlich ist. Einschränkungen bei der Auslegung aller Optiken ergeben sich hauptsächlich durch die Verfügbarkeit von Linsen mit entsprechenden Brennweiten und Anti-Reflex-Beschichtungen. Anhand einer gewünschten Spot-Größe von $2,4 \text{ mm} \times 0,8 \text{ mm}$, sind in Tab. 4 beispielhaft die Brennweiten der notwendigen Linsen gelistet.

Das Fluoreszenzlicht wird schließlich durch das Objektiv eingefangen und durch den dichroitischen Strahlteiler und zwei weitere Filter geführt, bevor es durch eine Sammellinse auf den Detektor (SensL MiniSM-30035) geleitet wird. Bei diesem Detektor handelt es sich um ein pixeliertes APD-Array (*engl. für 'avalanche photo diode array'*), das eine aktive Fläche von $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ besitzt und über 4775 Pixel/Mikrozellen verfügt. Jede dieser Zellen arbeitet als eigenständiger Photomultiplier und erreicht eine Verstärkung von $2,3 \times 10^6$. Dadurch dass alle Pixel unabhängig voneinander arbeiten, wird die Totzeit des Detektors stark verringert und die Dynamik somit stark vergrößert. Der Detektor arbeitet mit einer Bias-Spannung von etwa 27 V und liefert eine maximale Ausgangsspannung von 1,4 V bei einer Ausgangsimpedanz von 50Ω . Die Bandbreite des Detektors ist auf 20 MHz begrenzt. Für bessere SNR Eigenschaften kann der Detektor mithilfe eines Peltier-Elementes zusätzlich gekühlt betrieben werden.

Die Sammellinse unmittelbar vor dem Detektor sollte bei einer Maskenlänge von 1,25 mm eine Brennweite von 20 mm besitzen, um das gesamte Fluoreszenzsignal auf den Detektor abbilden zu können.

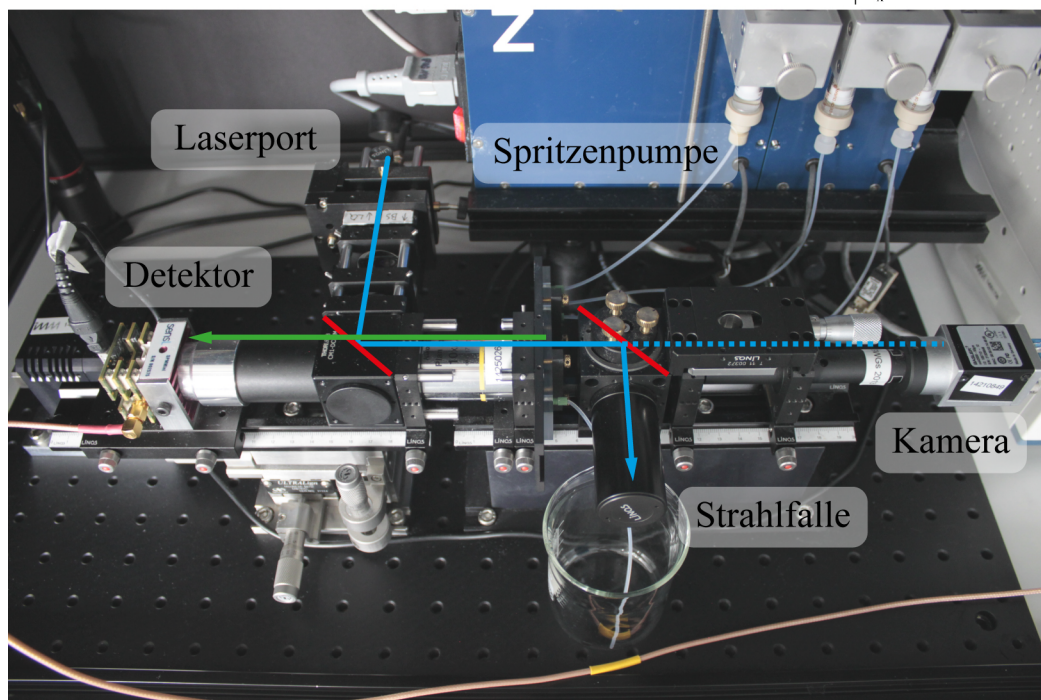
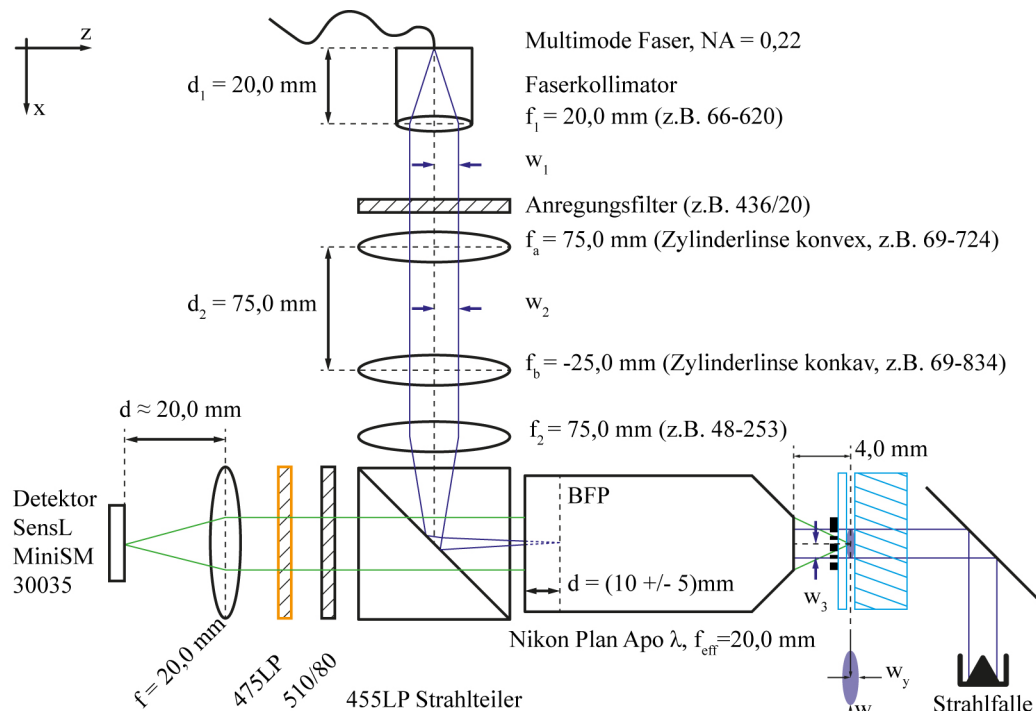


Abb. 5.4: Versuchsaufbau nach dem Schema eines Epi-Fluoreszenzmikroskops. Der Laser wird über eine Faser in das System eingekoppelt und kollimiert (Linse mit Brennweite f_1), per Anregungsfilter von langwelligen Anteilen befreit und dann durch ein konvex/konkaves Zylinderlinsenpaar in Teleskop-Konfiguration elliptisch geformt (Linsen mit Brennweiten f_a und f_b). Anschließend wird der Strahl mithilfe einer weiteren Linse (Brennweite f_2) und dem Mikroskopobjektiv (ebenfalls in Teleskop-Konfiguration) auf die gewünschte Spot-Größe (hier: $2,4 \text{ mm} \times 0,8 \text{ mm}$) verkleinert und kollimiert und über einen dichroitischen Strahlteiler auf die Maske gerichtet. Das Fluoreszenzlicht tritt in entgegengesetzter Richtung durch die Maske hindurch, wird vom Objektiv gesammelt und durch den Strahlteiler und zwei weitere Emissionsfilter über eine Sammellinse (Brennweite $f = 20 \text{ mm}$) auf den Detektor (SensL MiniSM 30035) gelenkt. Der Strahl kann bei Bedarf mithilfe einer Kamera so justiert werden, dass die Detektionszone voll ausgeleuchtet wird. Linsen: Edmund Optics, Filter: AHF Analysentechnik

x-Achse		y-Achse	
NA der Faser:	0,22	NA der Faser:	0,22
Halber Öffnungswinkel:	0,22 rad	Halber Öffnungswinkel:	0,22 rad
Brennweite f_1 :	20,00 mm	Brennweite f_1 :	20,00 mm
Strahlradius w_1 :	4,51 mm	Strahlradius w_1 :	4,51 mm
Strahlradius w_{2x} :	4,51 mm	Brennweite f_a :	75,00 mm
Brennweite f_2 :	75,00 mm	Brennweite f_b :	-25,00 mm
Brennweite f_3 :	20,00 mm	Strahlradius w_{2y} :	1,50 mm
Strahlradius w_{3x} :	1,20 mm	Brennweite f_2 :	75,00 mm
Strahldurchmesser (1/e):	2,40 mm	Brennweite f_3 :	20,00 mm
		Strahlradius w_{3y} :	0,40 mm
		Strahldurchmesser (1/e):	0,80 mm

Tab. 4: Beispielrechnung für das optische System mit einer gewünschten Strahlgeometrie von 2,4 mm × 0,8 mm.

Insbesondere muss darauf geachtet werden, dass der optische Pfad zwischen Objektiv und Sammellinse nicht zu groß wird, um Verluste am Rand des Sichtfeldes durch die Divergenz der Lichts zu vermeiden.

5.1.4 Strukturierte Anregung und Feldsimulation

Das Prinzip der direkt modulierten Anregung stellt eine äußerst robuste Realisierungsmethode dar, weil es auf eine exakte Abbildung des Fluoreszenzlichts verzichtet. Voraussetzung für eine optimale Funktionsweise ist jedoch eine genaue erstmalige Einrichtung des optischen Anregungspfades. In Abb. 5.5 ist das Prinzip im laufenden Betrieb gezeigt. Links ist die Struktur des Anregungslichts zu erkennen, die im Kanal vollständig ausgeprägt ist. Rechts sind zwei Szenarien gezeigt, in denen der Laser einerseits optimal zur optischen Achse ausgerichtet ist (oben) und andererseits einen Versatz zur optischen Achse aufweist (unten).

Da sich ein Strahlversatz auf die Signalgestalt einzelner Zellen auswirkt, die sich ihrerseits nur für wenige Millisekunden in der Detektionszone befinden, hat sich zur Kalibrierung des Aufbaus eine zusätzliche Kamera zur Strahlpositionierung bewährt. Diese Kamera ist für den experimentellen Aufbau (Abb. 5.4)

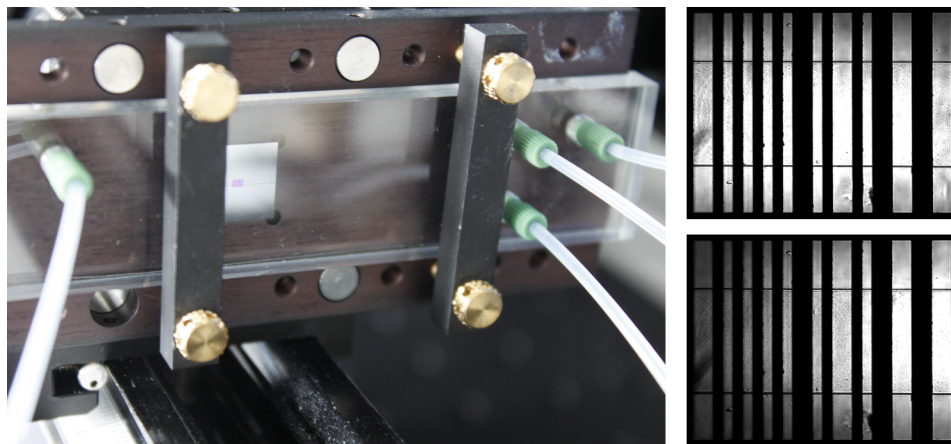


Abb. 5.5: Strukturierte Anregung durch die Maske. Gezeigt ist der Chip im Betrieb, bei dem das Anregungslicht gemäß der binären Struktur der Maske in den Kanal projiziert wird (links). Zur genauen Ausrichtung des Strahls wird optimalerweise eine Kamera verwendet, die sich in der Verlängerung des Objektivs befindet. Dadurch kann leicht ermittelt werden, ob der Strahl die Maske voll ausleuchtet (oben rechts) oder ob ein Strahlversatz des Lasers zur optischen Achse vorliegt (unten rechts).

in der Verlängerung der optischen Achse des Mikroskopobjektivs montiert und kann je nach Bedarf zur Justage herangezogen werden. Die in Abb. 5.5 gezeigten Aufnahmen sind ebenfalls mit dieser Kamera aufgenommen. Für die Verwendung der Kamera muss die Strahlfalle jedoch entfernt und der Laser im LED-Modus betrieben werden, um eine Sättigung des CCD-Chips zu vermeiden.

Skepsis bezüglich der direkt modulierten Anregung bestand vor allem wegen möglicher Interferenzeerscheinungen, die sich durch Lichtbeugung an der Apertur der Maske ergeben. Eine genaue Auskunft über den Intensitätsverlauf des Lichts im Kanal gibt das Kirchhoffsche Beugungsintegral, auf das an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird. Allgemein kann jedoch angenommen werden, dass sich Beugungseffekte drei verschiedenen Zonen zuordnen lassen.

Sei z_0 der Abstand einer Beobachtungsebene von einer Struktur mit Strukturgröße l und λ die Wellenlänge des Lichts, dann gilt gemäß Tab. 5:

$$\begin{array}{ll} z_0 \ll \frac{l^2}{\lambda} & \text{Fresnelbeugung (Nahfeld)} \\ z_0 \approx \frac{l^2}{\lambda} & \text{Übergangszone} \\ z_0 \gg \frac{l^2}{\lambda} & \text{Fraunhoferbeugung (Fernfeld)} \end{array}$$

Tab. 5: Das Beugungsbild einer optischen Apertur kann in Abhängigkeit der Strukturgröße und der Wellenlänge drei verschiedenen Zonen zugeteilt werden. Fresnelbeugung findet dabei im Nahbereich statt, in dem der Intensitätsverlauf durch die Gestalt der optischen Apertur geprägt ist. Für das Prinzip der strukturierten Anregung durch direkte Modulation ist diese Beugungsart dominierend.

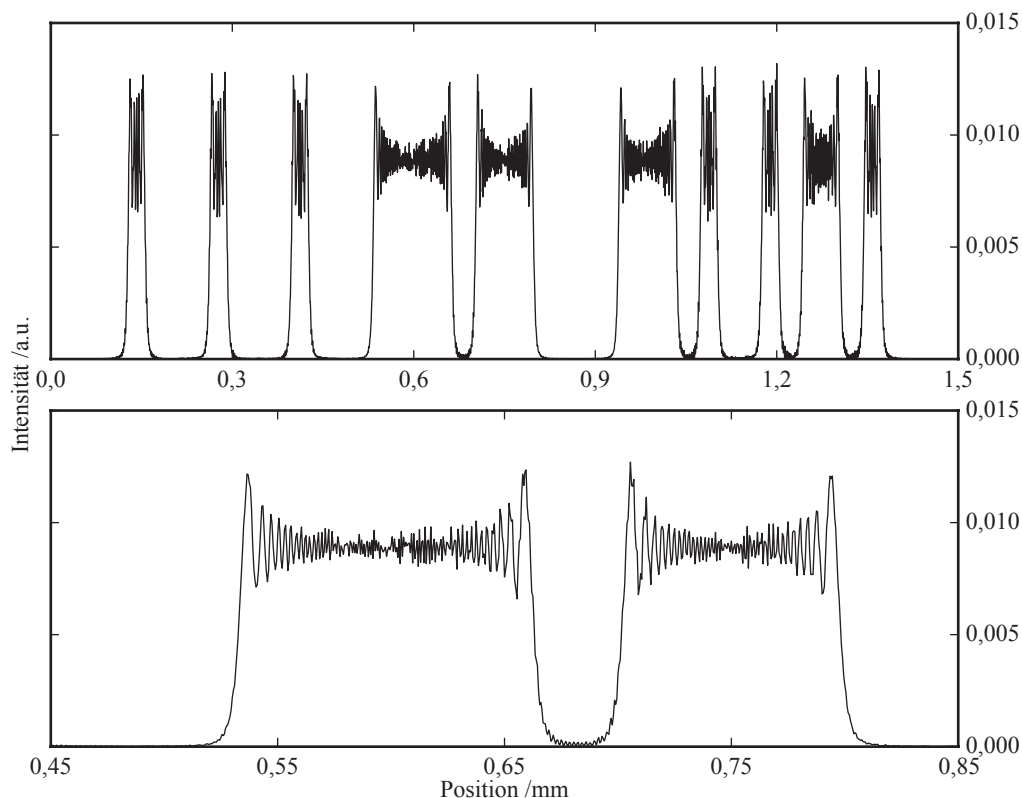


Abb. 5.6: Simulierter Intensitätsverlauf in der Kanalmitte durch Auswerten des Kirchhoffschen Beugungsintegrals. Im Nahfeld können Interferenzeffekte durch Beugung des Lichts an der Apertur der Maske weitestgehend vernachlässigt werden. Die schnellen Oszillationen des Anregungslichts für verschiedene Features (unten) kommen durch Beugung des Lichts an den Kanten der Maskenöffnungen zustande und werden durch die räumliche Ausdehnung der Zellen im Fluoreszenzsignal gemittelt.

Für den in dieser Arbeit verwendeten Chip ist der Abstand z_0 des Kanals von der Maske maßgeblich durch die Dicke der Deckelfolie ($125\,\mu\text{m}$) und die halbe Kanalhöhe ($10\,\mu\text{m}$) gegeben. Mit einer Strukturgröße von maximal $50\,\mu\text{m}$ und einer Anregungswellenlänge von $450\,\text{nm}$ ergibt sich damit:

$$135\,\mu\text{m} \ll \frac{(100\,\mu\text{m})^2}{450\,\text{nm}} = 5,56\,\text{mm}. \quad (154)$$

Für die gewählte Konfiguration ist daher mit Fresnelbeugung zu rechnen, die sich dadurch auszeichnet, dass Beugungseffekte höchstens durch die Aperturkante bedingt sind (Abb. 5.6). Der Intensitätsverlauf wird im Wesentlichen durch den Verlauf der Apertur geprägt. Schnelle Oszillationen des Anregungsmusters sind durch die Beugung des Lichts an den Kanten der Apertur bedingt und spielen für die Fluoreszenzemission eine untergeordnete Rolle, da die Zellen eine räumliche Ausdehnung besitzen und das Fluoreszenzsignal dadurch räumlich gemittelt (geglättet) wird. Für die Simulation in Abb. (5.6) wurde eine Maske der physikalischen Länge $L = 1,25\,\text{mm}$ und eine binären Länge von $N = 42$ gewählt. Sowohl die Simulation, als auch die praktische Anwendung zeigen, dass die strukturierte Anregung per direkter Modulation für die gewählte Geometrie sehr gute Resultate erzielt.

5.2 Kamera-Setup

Das Kamera-Setup ist der zweite experimentelle Aufbau, der im Rahmen dieser Arbeit entworfen und aufgebaut wurde. Der Zweck dieses Aufbaus besteht in erster Linie darin, die Arbeitsweise pixelierter Detektoren in Verbindung mit dem Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz zu untersuchen. Pixelierte Detektoren können unterschiedliche Konfigurationen haben und sich in Aufbau, Geschwindigkeit und Technik stark unterscheiden. Während für das Einzel-Detektor-Setup ein hochempfindlicher Detektor (APD-Array) verwendet wurde, der zudem eine hohe Dynamik aufweist, sind pixelierte Detektoren mit individuell auslesbaren Pixel oftmals nur als CCD- oder CMOS-Sensoren mit wesentlich geringerer Verstärkung verfügbar. Neben sogenannten Flächensensoren sind beide Technologien auch in Form von Liniendetektoren erhältlich, die aufgrund ihrer hohen Auslesegeschwindigkeit vorwiegend bei industriellen Prüfprozessen eingesetzt werden. Eine spezielle Art von Liniendetektoren sind sogenannte TDI-Sensoren (*engl. für time delayed integration*), die nicht nur eine einzige horizontale Linie aufweisen (z.B. 1×4096 Pixel), sondern mehrere (z.B. 96×4096 Pixel), siehe Abb. 5.7.

Die Besonderheit dieser Detektoren liegt in der vertikalen Verschaltung der Pixel, die es zulässt, dass die erzeugte Ladung einzelner Pixel entlang einer Spalte (z.B. 96 Pixel) gemäß eines vorgegebenen Taktes verschoben und aufintegriert werden kann. Durchläuft ein Werkstück den Sichtbereich der Kamera in vertikaler Richtung ist es möglich, den Pixel-Takt der Kamera so anzupassen, dass ein und derselbe Punkt des Werkstücks mehrfach aufgenommen wird. Das aufintegrierte Signal bietet dann - im Vergleich zu einer einzelnen Pixelreihe - einen sehr hohen SNR-Gewinn. Dieser skaliert mit \sqrt{V} , der Wurzel aus der

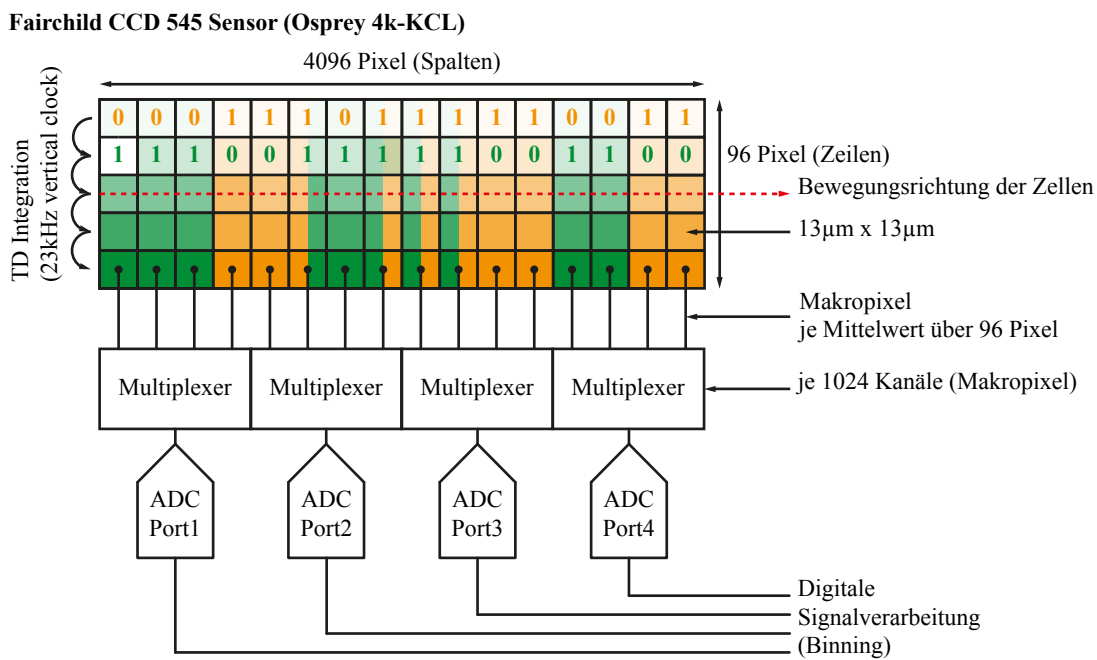


Abb. 5.7: TDI-Prinzip des Liniendetektors und Binning einzelner Sensorregionen zu mehreren parallelen Modulationssequenzen (multiple Detektionspfade). Ein TDI-Liniensensor integriert entstehende Ladungen in vertikaler Richtung mit einer vordefinierten Taktrate. Bei 96 TDI Stufen liegt am letzten Pixel der Mittelwert über alle 96 Pixel an, sodass von einem vertikalen Makropixel gesprochen werden kann. Jede Spalte lässt sich separat auslesen, sodass es per Software möglich ist, verschiedene Regionen des Chips im Nachgang zusammenzufassen. So lassen sich beispielsweise multiple Detektionspfade (orange/grün) parallel realisieren. Der CCD545 Chip von Fairchild Imaging verfügt über 4096×96 Pixel mit einer Pixelgröße von $13 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m}$ und einer maximalen Linienrate von ca. 23 kHz. Die Zellen bewegen sich im Gegensatz zu typischen TDI-Anwendungen entlang der Horizontalen des Chips.

Zahl der vertikalen Pixel V . So besitzt ein TDI-Detektor mit 96 vertikalen Pixel ein circa 10-fach höheres SNR als ein vergleichbarer Liniendetektor mit einer einzigen Pixelreihe (gleiche Pixelgröße).

Für den Nachweis von Zellen oder fluoreszierende Partikel besitzt ein TDI-Detektor nicht nur den Vorteil eines hohen SNR-Gewinns, sondern ist auch eine günstige und vergleichbar schnelle Alternative zu CMOS Detektoren. Die verhältnismäßig große Detektionsfläche der Detektoren (hier ca. $3\text{ mm} \times 54\text{ mm}$) lässt außerdem genügend Spielraum gegenüber Ausrichtungsfehlern, vor allem Verkippungen gegenüber der optischen Achse.

Im Gegensatz zu typischen TDI-Anwendungen, bei denen sich ein Objekt in vertikaler Richtung entlang der Sensorfläche bewegt, bewegen sich die fluoreszierenden Zellen/Partikel in dieser Arbeit entlang der Horizontalen des Sensors. Die Pixel werden dabei zu 96 TDI-Stufen verschaltet, sodass alle 96 Pixel einer Spalte als sogenanntes 'Makropixel' fungieren. Das Ausgangssignal des letzten Pixels liefert schließlich bei jedem Auslesevorgang den Signal-Mittelwert über die 96 Pixel der jeweiligen Spalte.

Ein Nachteil, der mit dem hohen SNR-Gewinn nach diesem Verfahren einher geht, sind geringfügige Signalverzerrungen in vertikaler Richtung, die durch die horizontale Bewegung der Zellen zustande kommt. Wird die Durchflussgeschwindigkeit jedoch genügend langsam gewählt, kann dieser Effekt sehr gut kompensiert werden.

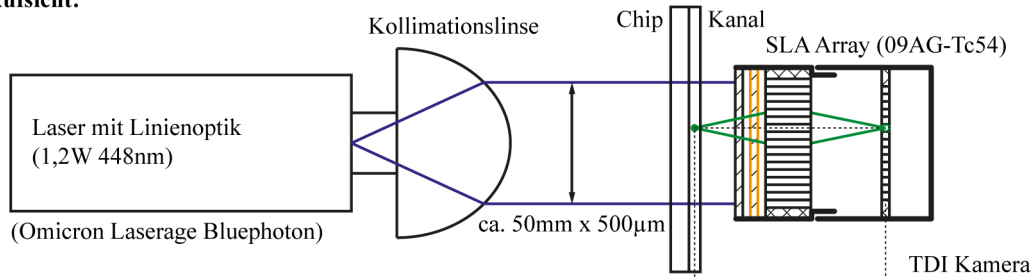
Der verwendete Detektor CCD545 der Firma Fairchild Imaging (jetzt: BAE Systems) ist als fertiges Kameramodul mit der Bezeichnung 'Osprey4k' erhältlich und kann mithilfe gängiger Camera-Link Karten ('Framegrabber') wie z.B. NI1427 von National Instruments ausgelesen werden. Ein entsprechender Treiber für die Kamera kann leicht über den frei verfügbaren 'camera file generator' von National Instruments erstellt werden. Die Kamera wird immer als 'Full-Frame Flächensensor' betrieben und liefert immer Bilder mit 96×4096 Pixel. Jede Zeile dieser Bilder (bei 96 TDI Stufen) ist zu einem jeweils anderen Zeitpunkt entstanden. Bei 96 TDI-Stufen entspricht daher der Intensitätswert eines jeden Pixel der durchschnittlichen Intensität aller 96 Pixel einer vertikalen Reihe des Sensors zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Zur optischen Anregung der Zellen wird ein Laser 'Blue Photon' der Firma Omicron Laserage verwendet. Dieser Laser besitzt eine zentrale Wellenlänge von 445 nm und liefert eine kollimierte Laserline von ca. $50\text{ mm} \times 0,8\text{ mm}$ bei einer maximalen Leistung von ca. 1,2 W.

Für den optischen Gesamtaufbau (Abb. 5.8) ist der Laser auf einer 6-Achsen Positioniereinheit montiert (5-Achsen Newport Ultralign + Goniometer), um den Laser entsprechend der Lage des Kanals ausrichten zu können. Da die Kamera entgegengesetzt zum Laser ausgerichtet ist, wird der Laser in einem Winkel zur optischen Achse betrieben. Dies verhindert, dass die Kamera direkt in die Lichtquelle 'blickt'. Zur weiteren Unterdrückung des Anregungslichts befinden sich vor dem Sensor zwei optische Filter, die ähnlich zum Einzel-Detektor-Setup gewählt sind (Farbglas E475 und Interferenzfilter HQ485LP, beide von AHF Analysentechnik) und sich vor allem im Durchmesser (50 mm) unterscheiden. Als Abbildungsoptik kommt eine sogenannte Gradienten-Index-Optik (GRIN-Linsen) zum Einsatz, wie sie üblicherweise in optischen Scannern (z.B. Flachbrettscannern) oder in der industriellen Bildverarbeitung zusammen mit Linienkameras verwendet wird. Bei der Optik handelt es sich konkret um ein zweireihiges GRIN-Linsen-Array der Bezeichnung '09AG-Tc54', das für einen Abstand von 54 mm zwischen Objekt- und Bildebene optimiert ist. Sowohl die Filter als auch das GRIN-Linsen Array sind in einem eigens für diesen Zweck entwickelten Objektiv eingebracht.

Abb. 5.8 (unten) zeigt den Gesamtaufbau im Betrieb. Klar zu erkennen sind die fluoreszierenden Partikel im Kanal, die sich auf der asphärischen Kollimationslinse des Lasers spiegeln. Die Aufnahme dieses Bildes ist durch eine Laserschutzbrille hindurch entstanden, sodass der Kontrast zwischen Anregungs- und Fluoreszenzlicht deutlich wird.

Aufsicht:



Seitenansicht:

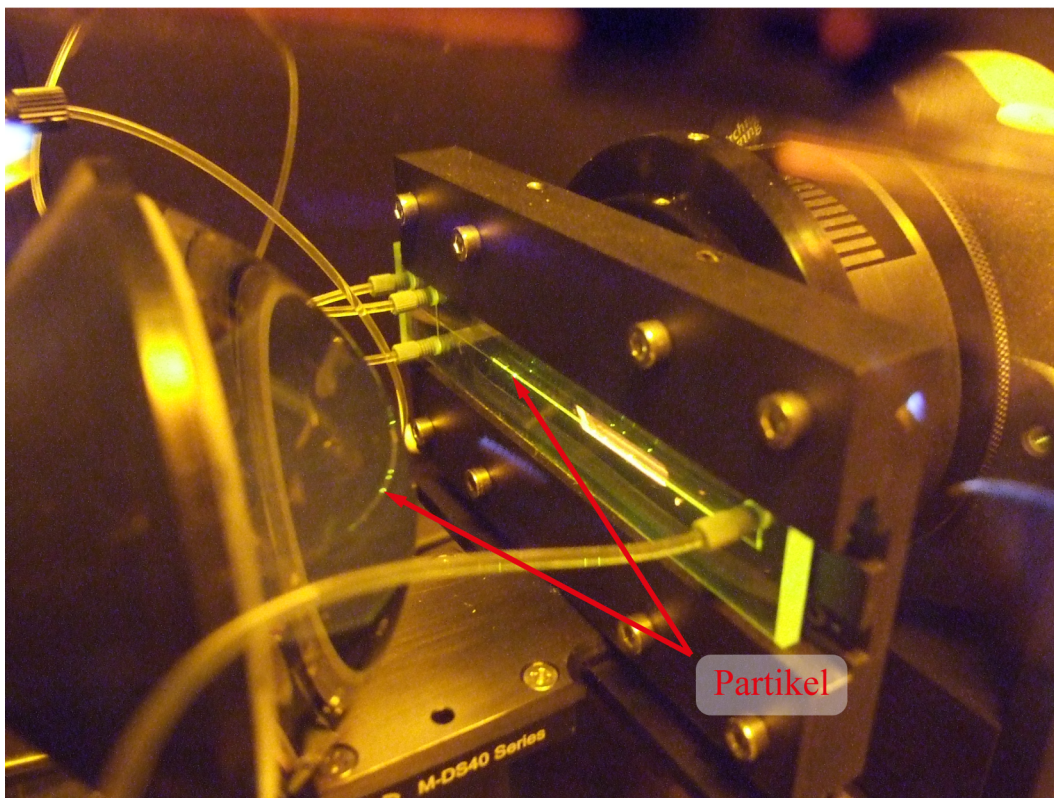
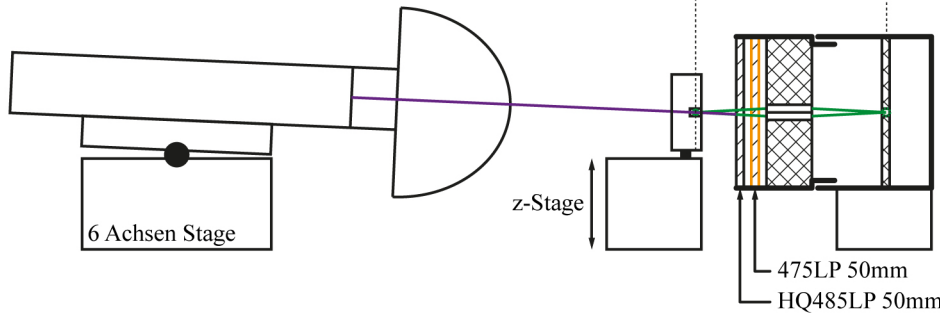


Abb. 5.8: Linienkamera-Setup bestehend aus Laser (Omicron Lasertechnik Blue Photon) mit integrierter Linien- und Kollimationsoptik, Chip, Objektiv und TDI-Liniendetektor (Fairchild Imaging Osprey4K). Oben: Das Objektiv beinhaltet zwei Filter zur Unterdrückung des Anregungslichts und ein zweireihiges GRIN-Linsen-Array, das das Fluoreszenzlicht auf die Sensorfläche der Kamera abbildet. Durch Verkippen des Lasers bezüglich der optischen Achse (siehe Seitenansicht), kann vermieden werden, dass die Kamera direkt in den Strahl der Anregung blickt. Unten: Foto des Aufbaus im laufenden Betrieb (fotografiert durch eine Laserschutzbrille). Deutlich zu erkennen sind einzelne fluoreszierende Partikel, die sich teilweise in der Kollimationslinse und der Rückseite des Chips spiegeln.

6 Experimente und Diskussion

In diesem Kapitel werden drei Experimente beschrieben, die am Einzel-Detektor-Setup und am Kamera-Setup durchgeführt wurden. Im ersten Experiment wird der SNR-Gewinn der in dieser Arbeit beschriebenen Pulskompressionsfilter am Einzel-Detektor-Setup mit Hilfe von fluoreszierenden Partikel gezeigt. Sowohl die theoretischen Erwartungen als auch die Vorgehensweise der Auswertung werden eingehend beschrieben, bevor das experimentelle Resultat bewertet und diskutiert wird. Bei einem zweiten Versuch am Einzel-Detektor-Setup werden spezifisch angefärbte Brustkrebszellen (MCF-7) detektiert und somit der Nachweis für die Verwendung des Prinzips mit biologischen Proben erbracht. Das dritte Experiment demonstriert die Implementierung multipler Detektionspfade auf einem pixelierten Detektor. Dazu werden bipolare Signale erzeugt, die auf einer entsprechenden Filterbank ausgewertet werden. Dieses Experiment soll in erster Linie den Beweis liefern, dass alle theoretischen Betrachtungen bezüglich multipler Detektionspfade praktisch zu realisieren sind.

6.1 Vergleich des SNR-Gewinns der Pulskompressionsfilter

Der SNR-Gewinn, der sich mit einem Pulskompressionsfilter maximal erzielen lässt, ist definiert als das Verhältnis aus maximaler Amplitude des Ausgangssignals und Rauschverstärkung des Filters. Bei einem Optimalfilter beispielsweise, entspricht die maximale Ausgangsamplitude der Signalenergie des erwarteten Eingangssignals. Dies gilt jedoch nicht für abweichende Filterdesigns, wie sie in Kap. 3.6 dieser Arbeit zu finden sind. In diesem Abschnitt wird daher der SNR-Gewinn verschiedener in dieser Arbeit vorgestellten Pulskompressionsfilter (Balanciertes Filter, Flankenfilter, NKO Filter) zunächst theoretisch berechnet, bevor die Werte anschließend experimentell überprüft werden. Die mathematischen Definitionen in diesem Abschnitt orientieren sich stark an [31].

Zur theoretischen Betrachtung wird angenommen, dass sich die binäre Modulationssequenz S der Länge N gemäß

$$S = \{s_0, s_1, \dots, s_{N-1}\} \quad s_n \in \{0, 1\} \quad (155)$$

darstellen lässt. Ein allgemeiner Pulskompressionsfilter H der Länge M sei gegeben mit:

$$H = \{h_0, h_1, \dots, h_{M-1}\}. \quad (156)$$

Der Einfachheit halber wird vorausgesetzt dass entweder $N = M$ oder $N = 3M$ gilt. Die Gründe hierfür sind in Kap. 3.6 erläutert.

Weiterhin wird eine Sequenz Z definiert, die nur aus Nullen besteht und zur zeitlichen Synchronisation von S und H dient (Zero-Padding). Sie besitzt die Länge $(M - N)/2$ und wird verwendet, um S zu S_0 zu erweitern:

$$S \longrightarrow S_0 = \{ZSZ\} = \begin{cases} \{S\} & \text{für } M = N \\ \{ZSZ\} & \text{für } M = 3N. \end{cases} \quad (157)$$

Für das Flankenfilter, das die Länge $M = N + 1$ aufweist, wird kein Zero-Padding vorgenommen. Das Ausgangssignal weist bei diesem Filtertyp zwei Extremwerte (positiver und negativer Peak) auf, die symmetrisch um Null sind (Abb. 3.7). Als maximale Ausgangsamplitude wird in diesem Fall der Maximalwert des Ausgangssignals herangezogen, der identisch mit dem Betrag des Minimums ist.

Die maximale Ausgangsamplitude des jeweiligen Pulskompressionsfilters ist analog zum Optimalfilter dann zu erwarten, wenn S_0 vollständig in das entsprechende Filter eingelaufen ist ($k = 0$) und die volle Signalenergie zur Verfügung steht. Insbesondere beim NKO Filter ist dies der Fall, da die Filterkoeffizienten entsprechend diesem Verhalten optimiert sind (Kap. 3.6.3). Der theoretisch maximale SNR-Gewinn $G_{\text{theo.}}$ kann dann ausgedrückt werden über

$$G_{\text{theo.}} = \frac{R_{HS_0}[0]}{A_N} = \frac{R_{HS_0}[0]}{\sqrt{\sum_n h[n]^2}}. \quad (158)$$

$R_{HS_0}[0]$ entspricht der Maximalamplitude des Kreuzkorrelationssignals von H und S_0 . A_N bezeichnet die Rauschverstärkung des Filters gemäß Gl. 87.

Alle Messungen der hier beschriebenen Untersuchung wurden mit einer Modulationssequenz der Länge $N = 42$ in T1-Transformation (LABS 76, siehe Anh. A) durchgeführt, wobei die physikalischen Abmessungen der Maske $1332\mu\text{m} \times 800\mu\text{m}$ betragen. Entsprechend der gewählten Sequenz sind die theoretischen Werte (SNR-Gewinn, PSLR, ISLR) für das Flankenfilter ($M = N + 1$), das Balancierte Filter ($M = N$) und das NKO Filter ($M = 3N$) in Tab. 6 zusammengefasst.

Filtertyp	$G_{\text{theo.}}$	PSLR	ISLR	Länge M
Flankenfilter	6,99	-40,00	-9,90	$N + 1$
Balanciertes Filter	10,12	-28,08	-7,37	N
NKO Filter	9,31	-46,71	-21,71	$3N$

(Alle Werte in dB)

Tab. 6: Theoretische Werte für den maximalen SNR-Gewinn $G_{\text{theo.}}$, PSLR und ISLR der verwendeten Modulationssequenz der Länge $N = 42$ in T1-Transformation (LABS 76, siehe Anh. A). Die Werte beziehen sich auf das Flankenfilter, das Balancierte Filter und das NKO Filter. Für das Flankenfilter wurde der charakteristische Unterschwinger (Maximaler negativer Ausschlag) bei der Berechnung des PSLR und ISLR nicht herangezogen (vgl. Abb. 3.7).

Für den experimentellen Nachweis des SNR-Gewinns wird ein Aufbau verwendet, der im Wesentlichen dem in Kap. 5.1 entspricht. Die Messungen sind in einer früheren Entwicklungsphase entstanden, bei der eine Abbildung des Fluorezenzlichts auf die Modulationsmaske stattgefunden hat. Für die Durchführung des Versuchs findet ein Chip mit einem Kanalquerschnitt von ca. $18\mu\text{m} \times 480\mu\text{m}$ Verwendung, durch den suspendierte fluoreszierende Partikel (Polysciences Fluoresbrite YG Microspheres $2,0\mu\text{m}$) geschickt werden. Die Partikel werden bereits in einer hochkonzentrierten Suspension geliefert, die laut Hersteller eine Partikeldichte von $5,68 \cdot 10^9 \frac{1}{\text{mL}}$ aufweist. Bevor die Partikel verwendet werden können, muss zunächst eine Verdünnung erfolgen. Dazu wird $1\mu\text{L}$ der ursprünglichen Suspension in 50mL gereinigtes Wasser pipettiert, was in einer Partikelkonzentration von $1,136 \cdot 10^5 \frac{1}{\text{mL}}$ bzw. $113,6 \frac{1}{\mu\text{L}}$ resultiert.

Neben dem Probenstrom wird zur hydrodynamischen Fokussierung der Partikel zusätzlich ein Hüllstrom (2 Einlässe) eingestellt. Die Flussraten für Proben- und Hüllstrom betragen jeweils $0,5 \frac{\mu\text{L}}{\text{s}}$, was zu einer Gesamtflussrate von $Q = 1,5 \frac{\mu\text{L}}{\text{s}}$ führt. Bei oben genannter Partikelkonzentration sind für die gewählte Flussrate ca. 57 Partikel pro Sekunde zu erwarten bzw. 1704 Partikel bei einer Messdauer von 30 Sekunden. Durch die Wahl dieser Flussraten und der Partikelkonzentration wird einerseits eine ausreichende Messstatistik gewährleistet, zum anderen befinden sich die Partikel größtenteils vereinzelt in der Detektionszone. Signalsuperpositionen werden somit weitgehend vermieden und der SNR-Gewinn kann ohne Störungen untersucht werden.

Für die gewählten Messparameter stellt sich schließlich eine enge Geschwindigkeitsverteilung ein (Abb. 6.1). Diese bewegt sich im Bereich von $210 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ bis $224 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ und tendiert zu einem Maximum bei einer

Geschwindigkeit von $220 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$. Genauere Untersuchungen zur Gestalt dieser Verteilung befinden sich in [23]. Bezogen auf den gesamten Geschwindigkeitsbereich beträgt die maximale relative Abweichung ca. $\pm 2,3\%$ um die mittlere Geschwindigkeit dieses Bereiches. Daher reicht eine Filterbank mit wenigen Kanälen (24) zur Partikelidentifikation aus. Signalnebenkeulen, die auf nicht-resonanten Geschwindigkeitskanälen zu Falscherkennungen führen, können daher fast vernachlässigt werden. Dies ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass die nächstliegenden Signalnebenkeulen in einem gewissen Abstand auf der Geschwindigkeitsachse zum Hauptpeak auftreten.

Für einen Pulskompressionsfilter unterscheidet sich der SNR-Gewinn bei benachbarten Kanälen nur gering. Daher wird der differenzielle Unterschied des SNR-Gewinns bei der gemessenen engen Verteilung im Folgenden nicht berücksichtigt. Auch die absolute Geschwindigkeit der Partikel spielt zur Untersuchung des SNR-Gewinns eine untergeordnete Rolle, sofern eine enge Geschwindigkeitsverteilung vorliegt.

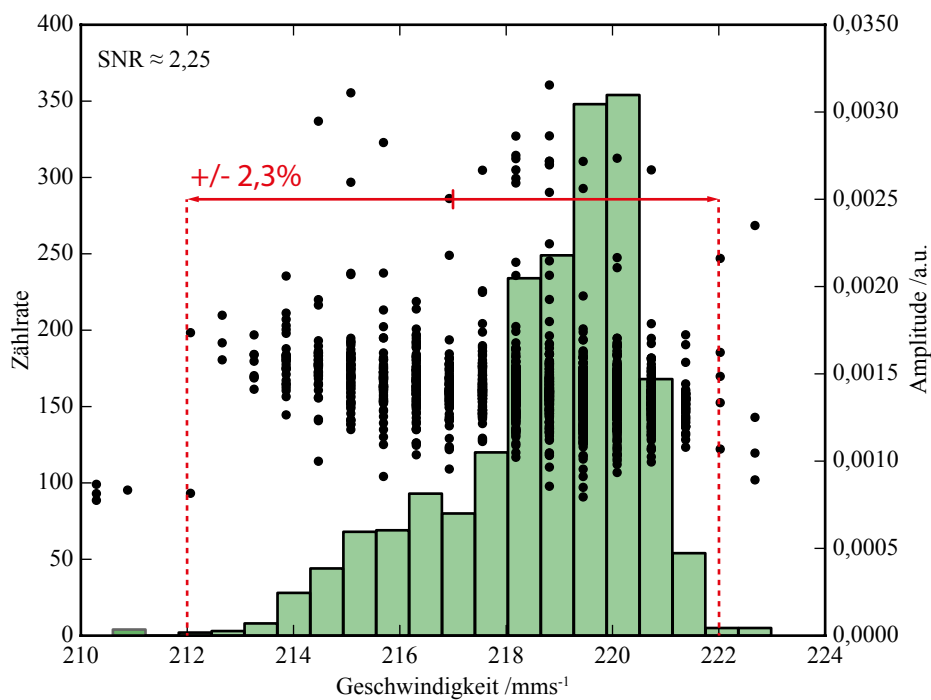


Abb. 6.1: Geschwindigkeits- und Intensitätsverteilung der gemessenen Ereignisse bei voller Laserleistung ($\text{SNR} \approx 2,25$). Die Ergebnisse demonstrieren die enge Verteilung im Bereich von $210 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ bis $224 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$. Bezogen auf den Mittelwert dieses Geschwindigkeitsbereiches treten alle Ereignisse in einem Fenster von $\pm 2,3\%$ auf. Daher reichen 24 Kanäle für die Auswertung der Daten aus.

Die Ermittlung des SNR-Gewinns kann nur dann erfolgen, wenn sowohl das SNR des Eingangssignals (SNR_E), als auch das SNR des Ausgangssignals bekannt sind. Während die SNR-Bestimmung des Ausgangssignals zumeist problemlos möglich ist, wird das SNR des Eingangssignals für das hier durchgeführte Experiment über die Laserleistung p (prozentuale Einstellung) variiert. Dazu muss zunächst der Zusammenhang zwischen Laserleistung und SNR_E hergestellt werden (Abb. 6.4) und die Laserleistung wird sukzessiv in kleineren Schritten (2 % Schritt im Bereich von 0 % bis 20 %), dann in größeren Schritten (5 % im Bereich von 20 % bis 50 %, 10 % im Bereich von 50 % bis 100 %) erhöht. Durch die lineare Abhängigkeit der Laserleistung von der prozentualen Einstellung am Bedienfeld, entspricht eine Leistungsvariation von 1 % 12,8 mW. Für die Bestimmung der Signalamplituden der Eingangssignale werden die Signaldatensätze durch das Balancierte Filter auf mehreren Kanälen verarbeitet. Durch entsprechende Normierung der Filter (Signalamplitude der Eingangssignale entspricht der maximalen Amplitude des Ausgangssignale) kann dann auf die Signalamplitude der Eingangssignale und somit auf das

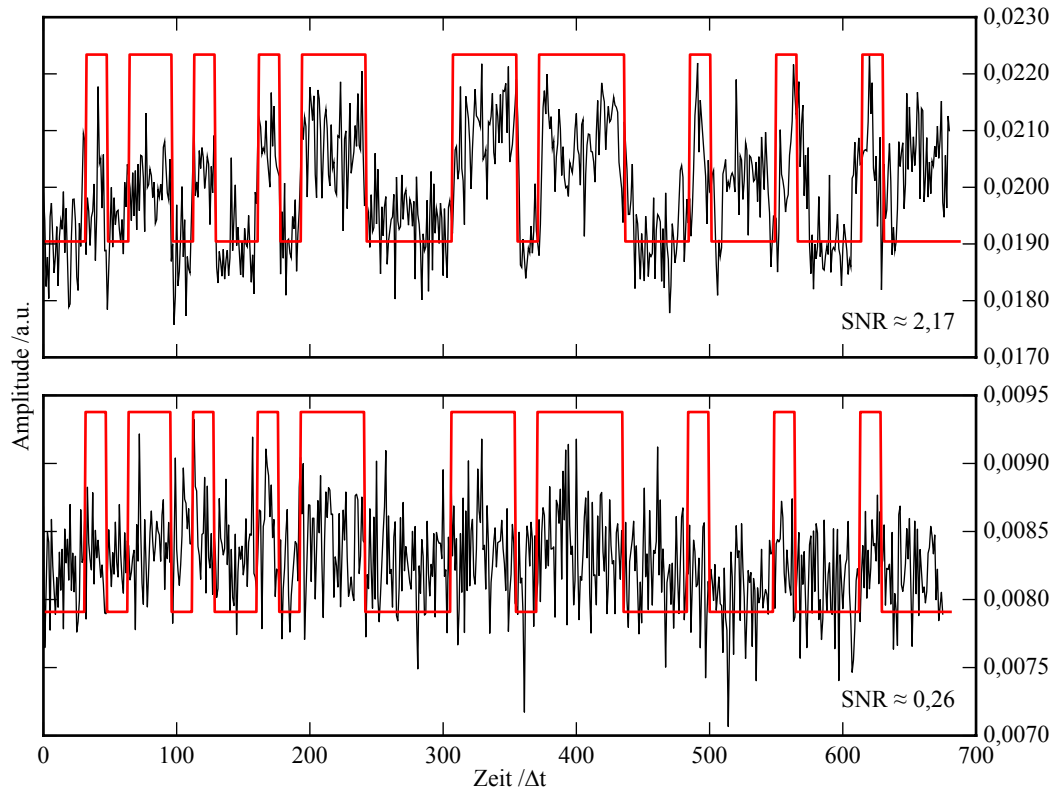


Abb. 6.2: Signalverläufe (Rohsignale) von $2\mu\text{m}$ Partikel bei verschiedenen Signal-zu-Rausch-Verhältnissen.

entsprechende SNR der Eingangssignale bei unterschiedlichen Leistungseinstellungen des Lasers rückgerechnet werden. Beispiele für Signalformen bei verschiedenen Signal-zu-Rausch-Verhältnisse sind in Abb. 6.2 gezeigt, Streudiagramme des Balancierten Filters für verschiedene Signal-zu-Rausch-Einstellungen sind mit Abb. 6.3 gegeben.

Durch Auswerten aller Rausch- und Signalmessungen erhält man somit für jede Laserleistung ein Wertepaar aus Rausch- und Signalamplitude. Beide Größen zeigen eine nahezu lineare Abhängigkeit von der Laserleistung, sodass beide Verläufe mit einer linearen Funktion gefittet werden (siehe Abb. 6.4). Da die Signalamplituden bei zu schwachen Laserleistungen starken Schwankungen unterliegen, werden für den Fit nur Werte oberhalb einer Laserleistung von 35 % (448 mW) herangezogen. Für den Fit der Signale in Abb. 6.4 wird außerdem eine Ursprungsgerade angenommen, da bei 0 % Laserleistung kein Fluoreszenzlicht zu erwarten ist. Für den Fit der Rauschamplitude wird hingegen ein Offset zugelassen, da Rauschen nicht nur durch den Laser (Streulicht, Intensitätsschwankungen, etc.) bedingt ist, sondern auch andere Ursachen hat (z.B. elektronisches Rauschen). Das Balancierte Filter zeigt den insgesamt höchsten SNR-Gewinn, sodass der der Signal-Fit an diesem Filter vorgenommen und der Zusammenhang zwischen Laserleistung und SNR_E auf dieses Filter referenziert wird.

Gemäß der Fitfunktion

$$f(p) = mp + f_0 \quad (159)$$

erhält man für die Fitparameter die Werte in Tab. 7.

Das SNR der Eingangssignale für verschiedene Laserleistungen lässt sich folglich berechnen über:

$$\text{SNR}_E(p) = \frac{1,1636 \times 10^{-5} \times p}{1,9768 \times 10^{-6} \times p + 3,3775 \times 10^{-4}} \quad (160)$$

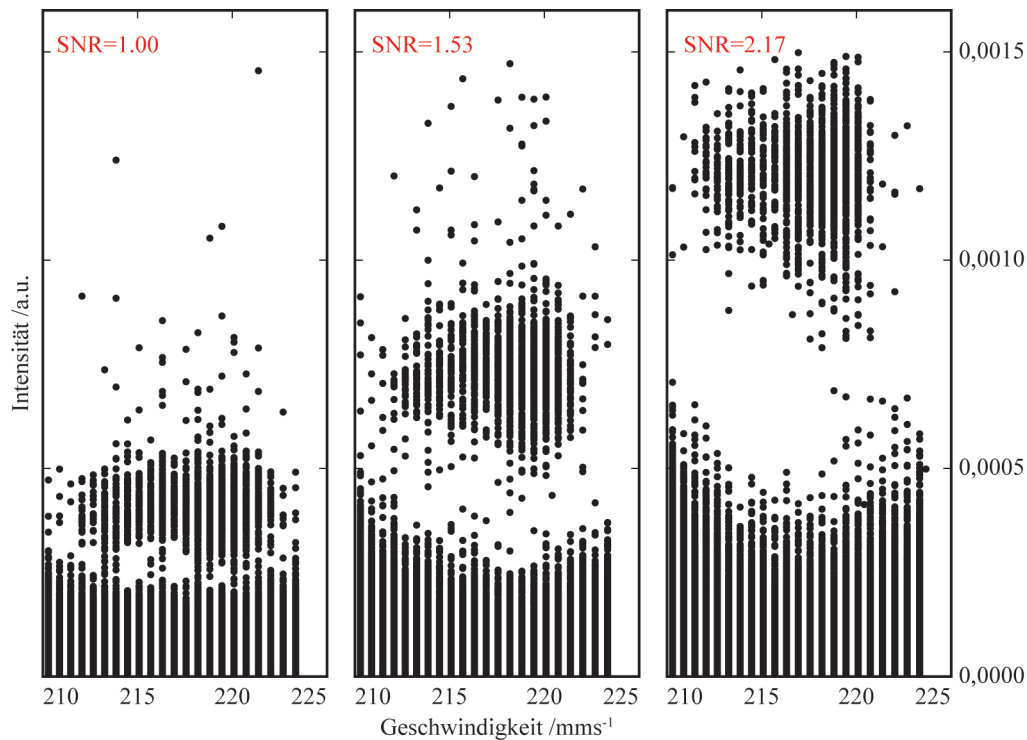


Abb. 6.3: Streudiagramme des Balancierten Filters für verschiedene SNR-Einstellungen. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die Signalpeaks, als auch der Rauschhintergrund mit steigender Laserleistung wächst und somit ein relativer Schwellwert gesetzt werden muss.

	m	f_0
Signal	$1,1636 \times 10^{-5}$	n.V.
Rauschen	$1,9768 \times 10^{-6}$	$3,3775 \times 10^{-4}$

Tab. 7: Fitparameter aus den Amplitudenwerten der Signalpeaks (Balanciertes Filter) und der Standardabweichung des Rauschens unter Variation der Laserleistung.

Ergänzenderweise sollte erwähnt sein, dass sich zur Abschwächung des Fluoreszlichtes zusätzlich Graufilter (OD 1,0 + OD 0,3) im Detektionspfad befinden, was die Transmission auf ca. 5 % verringert. Nur mithilfe dieser Filter ist es möglich, einen geeigneten Bereich nahe am Rauschen zu vermessen.

Es sei an dieser Stelle vorweggenommen, dass die untersuchten Filter selbst bei hohen Laserleistungen (hohes SNR der Eingangssignale, d.h. optimale Detektionsbedingungen) untereinander Abweichungen bezüglich der Signalamplituden zeigen (Abb. 6.4). Dies bedeutet, dass unterschiedliche Filter auf dem selben Datensatz eine unterschiedliche mittlere Amplitude der Eingangssignale ermitteln. Die Ursache hierfür liegt in der Konstruktion und Normierung der Filter, die jeweils anhand theoretischer Signale (Referenzsignale) erfolgen. Diese Abweichungen lassen sich insbesondere erklären durch:

- Unterschiedliche Längen der Filter
- Unterschiedliche Zahl an Flanken und Werten auf den Flanken
- Abweichungen der Referenzsignale und Filter von den realen Signalen
- Willkürliche Festlegung der Phase (Phasen Anpassung)
- Rundungsfehler

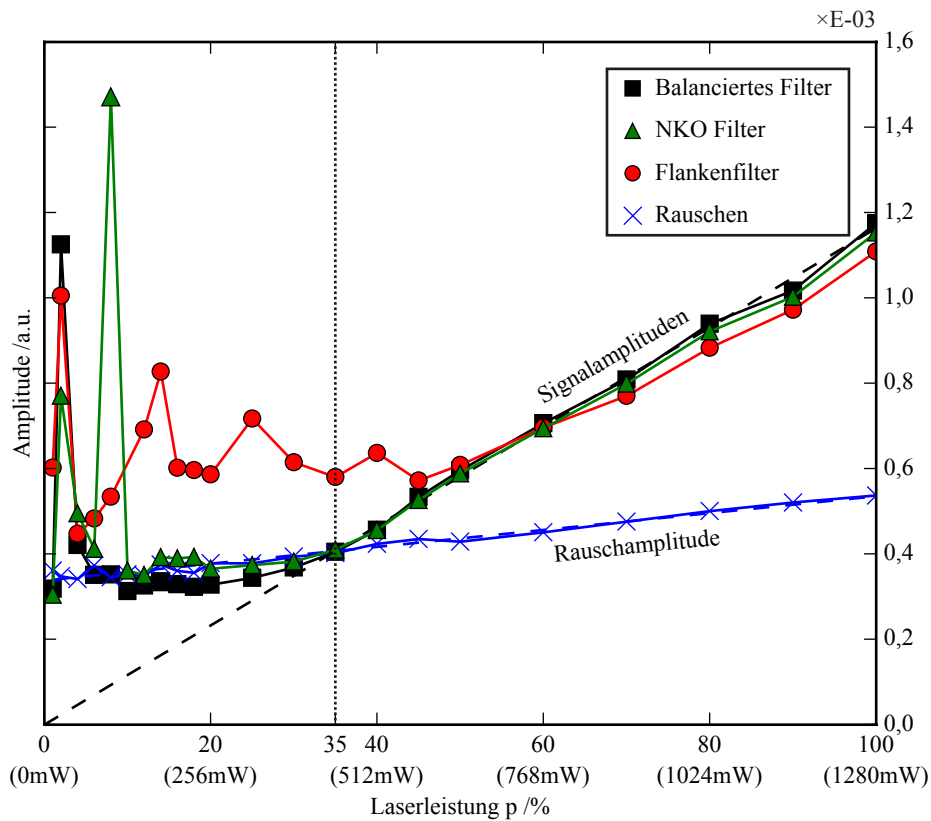


Abb. 6.4: Amplitudenwerte der Signalpeaks und Standardabweichung des Rauschens unter Variation der Laserleistung p . Es ist zu beobachten, dass sowohl Signalstärke als auch Rauschen linear mit der Laserleistung ansteigen. Sowohl das Balancierte Filter als auch das NKO Filter zeigen einen deutlich besseren Signalgewinn als das Flankenfilter, da sie mit abnehmender Laserleistung ihren linearen Trendverlauf am längsten beibehalten. Das Flankenfilter hingegen zeigt bereits deutliche Abweichungen vom linearen Verlauf bei einer Laserleistung von 40 % (512 mW). Daher werden die Ausgangssignale des Balancierten Filters als Referenz zur Berechnung des SNR der Eingangssignale herangezogen. Dazu werden der Signalverlauf des Balancierten Filters, als auch die Rauschwerte linear gefittet, um den funktionellen Zusammenhang zwischen (prozentualer) Laserleistung und SNR der Eingangssignale herzustellen.

Daraus resultiert ein systematischer Fehler, der beim relativen Vergleich des SNR-Gewinns verschiedener Filter zu Abweichungen gegenüber der theoretischen Vorhersage führt, trotzdem jedoch ein signifikantes experimentelles Ergebnis erkennen lässt.

Zum Vergleich des SNR-Gewinns wird schließlich die Zählrate der Partikel bei verschiedenen Laserleistungen herangezogen. Dabei ist es vor allem bei niedriger Laserleistung wichtig, gültige Signale (Signalpeaks) von Rauschsignalen (Rauschpeaks) sauber zu trennen. Zur Generierung der Peaks wird zunächst in jedem Zeitschritt das Maximum auf der Geschwindigkeitsachse gesucht und mit der Geschwindigkeitsinformation und der Peakbreite in Samples gespeichert. Dadurch ergibt sich eine eindimensionale Abfolge von Werten, in der sowohl Signalnebenkeulen, Rauschpeaks sowie gültige Signalpeaks enthalten sind. Die gültigen Signalpeaks in dieser Abfolge werden schließlich über gewisse Ausschlusskriterien ermittelt. Zum Einen werden nur positive Peaks einer gewissen Mindestbreite (konkret: 21 Samples) weiterverarbeitet. Zum Anderen kann ein relativer Schwellwert zur Identifikation gültiger Signalpeaks eingeführt werden. Da die Amplituden der Rauschpeaks, als auch die der Signalpeaks mit der Laserleistung anwachsen, wird der Schwellwert als relativer Wert definiert und alle gefundenen Peaks zunächst auf den Median aller Peaks normiert (Abb. 6.5).

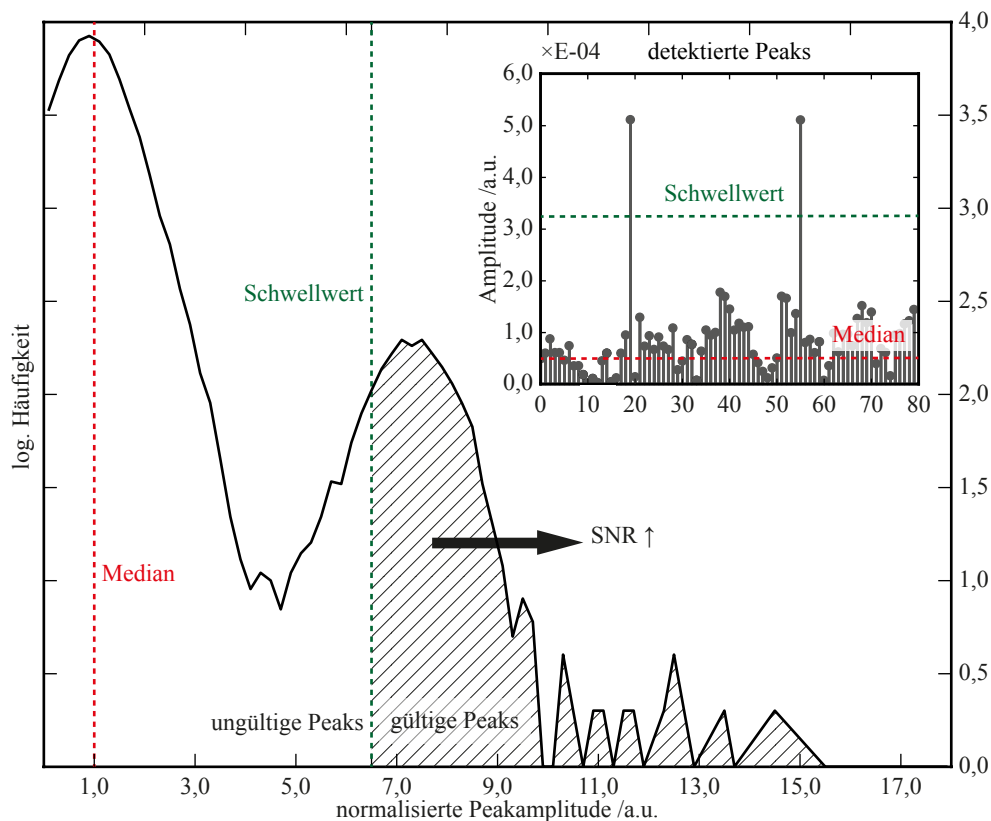


Abb. 6.5: Normierte Verteilung gefundener Peaks bei einer Laserleistung von 45 % (576 mW). Die Normierung erfolgt gemäß des Median einer gewissen Zahl an fortlaufend gefundenen Peakamplituden (oben rechts). Bei ansteigender Laserleistung bilden sich zwei Häufungen: Eine bei einem relativen Amplitudenwert von Eins (Rauschpeaks) und eine bei einem deutlich höheren Wert (Signalpeaks). Der verwendete Filter ist ausschlaggebend dafür, ab welcher kritischen Leistung, (d.h. kritischem SNR) sich die Verteilung der Signalpeaks von der Rauschverteilung löst. Auch der Anstieg der Zählrate hängt vom verwendeten Filter ab. Führt man einen relativen Schwellwert ein (hier: 6,5), so wird dieser Schwellwert jeweils bei einer anderen kritischen Laserleistung überschritten.

Diese Vorgehensweise ist insofern legitim, da die meisten Peaks bei gegebener Partikelkonzentration und selbst bei vorgegebener Mindestbreite ohnehin im Rauschen gefunden werden. Als Resultat erhält man für die gefunden, potenziellen Signalpeaks zwei Verteilungen, von denen sich eine bei einer (normierten) Amplitude von Eins befindet und eine weitere bei einem höheren relativen Amplitudenwert. Bei der Verteilung um Eins handelt es sich um alle Rauschpeaks, bei der zweiten Verteilung um die tatsächlichen Signalpeaks. Zur besseren Veranschaulichung sind die Zählraten in Abb. 6.5 logarithmiert. Der zugehörige Datensatz wurde bei einer Laserleistung von $p = 45\%$ (576 mW) aufgenommen.

Für die Variation der Laserleistung von niedrigen hin zu hohen Werten, ließe sich anhand einer Serie von Abbildungen gemäß Abb. 6.5 erkennen, dass sich die Verteilung gültiger Signalpeaks langsam von der Verteilung der Rauschpeaks löst und nach rechts, hin zu höheren relativen Amplitudenwerten, wandert. Der Anstieg des SNR und somit der Zählrate läuft für die verwendeten Filter unterschiedlich schnell ab. D.h. dass die Zählraten gültiger Signalpeaks mit der Laserleistung für verschiedene Filter unterschiedlich schnell wachsen und den relativen Schwellwert somit unterschiedlich schnell (in Abhängigkeit anwachsenden Laserleistung) passieren. Dadurch ergeben sich für die Zählraten in Abhängigkeit der Laserleistung und Filter unterschiedliche Steigungen im Bereich des kritischen SNR (vgl. Abb. 6.6). Der Schwellwert wird für die hier beschriebene Auswertung auf einen relativen Wert von 6,5 festgelegt. Dieser Wert erweist sich aus zwei Gründen als besonders geeignet. Einerseits wird sichergestellt, dass

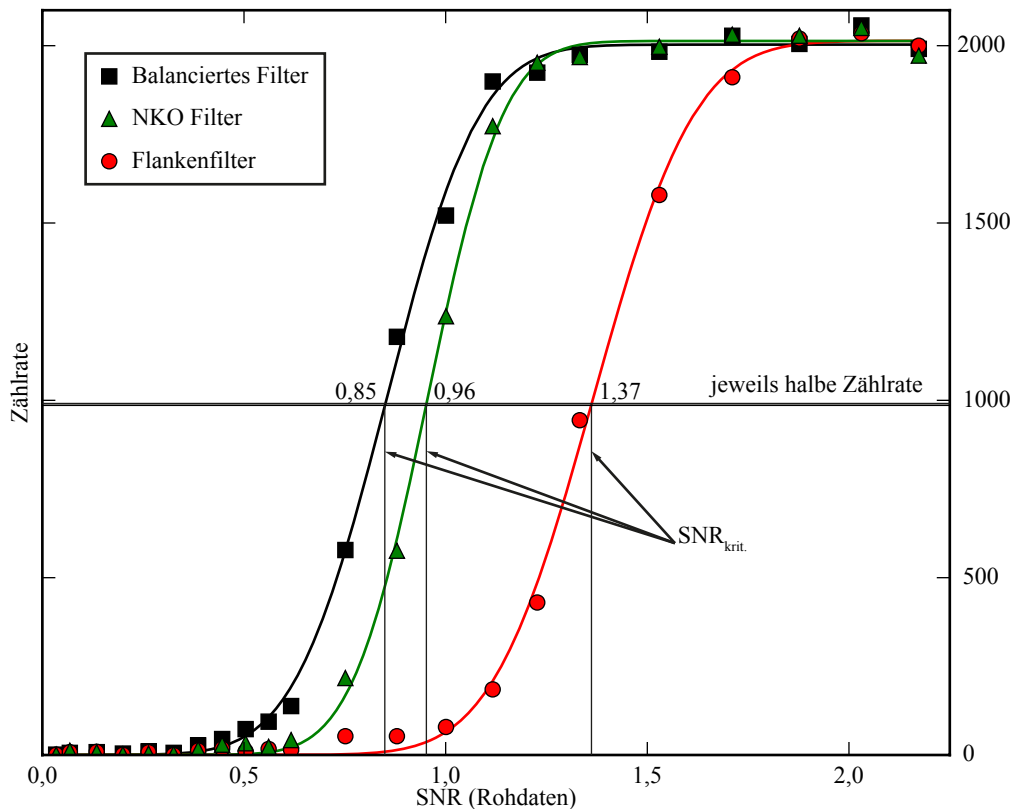


Abb. 6.6: Zählraten der verwendeten Pulskompressionsfilter in Abhängigkeit des SNR der Eingangssignale. Legt man den Verteilungen der Signalpeaks eine Gauß-Verteilung zugrunde, so lassen sich die Zählraten gemäß der Gaußschen Fehlerfunktion fitten. Die halbe (maximale) Zählrate wird beim jeweiligen kritischen SNR erreicht.

alle Filter für ein vergleichsweise hohes SNR (hier $\text{SNR} = 2$) die gleichen Zählraten aufweisen und somit nicht zu hoch angesetzt ist. Andererseits bleiben Rauschpeaks und Peaks von Signalnebenkeulen unterhalb des relativen Schwellwertes, sodass die Zählraten für alle Filter bei geringen Laserleistungen gegen Null konvergieren und keine erneuten Anstiege durch ungünstige Signalpeaks erfahren. Von letzterem Standpunkt aus gesehen, ist der relative Schwellwert somit ausreichend hoch gewählt und es resultieren schließlich die Zählraten in Abb. 6.6.

Anhand der Zählraten lässt sich erkennen, dass das absolute Zählergebnis für alle Filter bei hoher Laserleistung nahezu gleich ist. Geringfügige Unterschiede des absoluten Zählergebnisses kommen durch die unterschiedlichen Signalnebenkeulen zustande. Mit einer maximalen Zählrate von ca. $2000 \frac{1}{s}$ wird die theoretische Erwartung von $1704 \frac{1}{s}$ übertroffen. Dies liegt im Bereich des zu erwartenden Verdünnungsfehlers bei Aufnahme von $1 \mu\text{l}$ Partikelsuspension. Trotz dieser Abweichung zeigen alle Filter ein fast identisches Zählergebnis für hohe Laserleistungen. Das unterschiedliche Dynamikverhalten der Filter bei Partikelsuperposition sei hier ebenfalls als Fehlerquelle erwähnt. So kann das Flankenfilter aufgrund seiner hohen Signalnebenkeulen keine eindeutige Unterscheidung zwischen zwei nah beieinanderliegenden Signalpeaks vornehmen und es gehen Ereignisse verloren. Um sicherzustellen, dass die Zählraten zwischenzeitlich keinen starken Schwankungen unterliegen, wurde zwischen jeder Leistungsvariation des Lasers eine Referenzmessung bei 100 % (1280 mW) Laserleistung durchgeführt. Weiterhin lässt sich erkennen, dass das Flankenfilter mit dem theoretisch niedrigsten SNR-Gewinn als erstes gegen eine Zählrate von Null strebt, während sich das Balancierte Filter mit dem theoretisch höchsten SNR-Gewinn am längsten behaupten kann.

Ein genauer Vergleich des SNR-Gewinns der Filter erfolgt über einen Fit der jeweiligen Zählraten mit der Gaußschen Fehlerfunktion. Dabei wird angenommen, dass den gefundenen Signalpeaks eine Gauß-Verteilung zugrunde liegt. Die bei Null beginnende (untere Integralgrenze) Gaußsche Fehlerfunktion ist gegeben mit:

$$\Phi_0(\text{SNR}_E) = \frac{A}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \int_0^{\text{SNR}_E} e^{-\frac{(x-\text{SNR}_{\text{krit.}})^2}{2\sigma^2}} dx. \quad (161)$$

Dabei bezeichnet A die maximale Zählrate des jeweiligen Filters, $\text{SNR}_{\text{krit.}}$ das kritische SNR, bei dem die Zählrate auf den halben Wert einbricht und σ die Standardabweichung der Normalverteilung. Aus den Fits nach Levenberg-Marquardt erhält man die Fitparameter in Tab. 8.

Filtertyp	$\text{SNR}_{\text{krit.}}$	$\Delta\text{SNR}_{\text{krit.}}$	A	ΔA	σ	$\Delta\sigma$
Flankenfilter	1,36576	0,00019	1981,96	0,55	0,19754	0,00025
Balanciertes Filter	0,85257	0,00015	1971,45	0,38	0,18096	0,00019
NKO Filter	0,95535	0,00014	1981,61	0,39	0,14764	0,00019

(alle Werte linear)

Tab. 8: Fitparameter der Gaußschen Fehlerfunktionen.

Die Unsicherheiten, die sich bei der Ermittlung des kritischen SNRs für den jeweiligen Filter ergeben, sind durch die Breite der Peakverteilungen (gültige Peaks) gegeben. Die Verbreiterung der Verteilungen hat dabei verschiedene Ursachen. Beispielsweise weisen die Partikel eine gewisse Größenverteilung auf, die zu einer verbreiterten Intensitätsverteilung führt. Zum anderen kann nicht garantiert werden, dass Partikel der gleichen Größe die gleiche Farbstoffmenge tragen und somit gleiche Intensitätssignale liefern. Die Unsicherheit, die durch den verwendeten Filter zustande kommt und als eigentlicher Messfehler aufgefasst werden müsste, ist vor allen anderen Verbreiterungsmechanismen vernachlässigbar. Um diesen Fehler eindeutig zu bestimmen, müssten alle anderen Unsicherheiten genau bestimmt werden, was jedoch selbst mit konventionellen Durchflusszytometern kaum möglich ist. In der Dissertation von Christian Sommer [23] konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass die Schwankungsbreite der Fluoreszenzintensität von der Partikel-Größenverteilung dominiert wird und nicht von der Messunsicherheit. Die eigentlichen experimentellen Abweichungen von der Theorie sind größtenteils dem vormals diskutierten systematischen Fehler geschuldet, der sich bei Generierung der Filter und Referenzsignale auf vielen Kanälen ergibt.

Die Fehlerangaben (Standardabweichungen) in Tab. 8 wurden daher aus den Kovarianz-Matrizen der Fits ermittelt und geben einen groben Anhaltspunkt über die statistische Unsicherheit der Auswertung und sind vor den verhältnismäßig großen systematischen Fehlern der Messung und Auswertung durch die Filter vernachlässigbar.

Anhand der kritischen SNR-Werte kann schließlich der relative SNR-Gewinn der Filter aus den experimentellen Daten berechnet werden. Dazu wird das Flankenfilter mit dem theoretisch wie auch experimentell schlechtesten SNR-Gewinn als willkürlicher Referenzpunkt festgelegt.

Der jeweilige SNR-Gewinn $G_{\text{exp.}}^{\text{rel.}}$ relativ zum Flankenfilter (FF) berechnet sich dann gemäß:

$$G_{\text{exp.}}^{\text{Bal.}} = \frac{\text{SNR}_{\text{krit.}}^{\text{FF}}}{\text{SNR}_{\text{krit.}}^{\text{Bal.}}} = 1,6019 \quad (162)$$

$$G_{\text{exp.}}^{\text{NKO}} = \frac{\text{SNR}_{\text{krit.}}^{\text{FF}}}{\text{SNR}_{\text{krit.}}^{\text{NKO}}} = 1,4296. \quad (163)$$

Zur Berechnung des relativen theoretischen SNR-Gewinns $G_{\text{theo.}}^{\text{rel.}}$ wird von jedem theoretisch ermittelten Wert $G_{\text{theo.}}$ der theoretische SNR-Gewinn des Flankenfilters (6,99 dB) subtrahiert. Tab. 9 gibt eine Zusammenfassung der experimentellen Daten (logarithmisch) und zieht einen Vergleich zur theoretischen Vorhersage.

Filtertyp	$G_{\text{theo.}}^{\text{rel.}}$	$G_{\text{exp.}}^{\text{rel.}}$	ΔG
Flankenfilter	+0,00	+0,00	+0,00
Balanciertes Filter	+3,13	+4,09	+0,96
NKO Filter	+2,32	+3,10	+0,78

(Alle Werte in dB)

Tab. 9: Vergleich der theoretischen und experimentellen Werte des SNR-Gewinns. Alle Werte sind referenziert auf das Flankenfilter, das den schlechtesten SNR-Gewinn zeigt. Die experimentellen Abweichungen zur Theorie sind erheblich und zeigen, dass systematische Fehler in der Filter- und Referenzsignalkonstruktion große relative Unterschiede zwischen verschiedenen Filterdesigns hervorrufen können (siehe Text). Diese Abweichungen sind jedoch relativ und sagen nichts über den absoluten SNR-Gewinn der Filter aus.

Insgesamt sind starke Abweichungen zwischen den experimentellen Resultaten und den theoretischen Vorhersagen zu beobachten. Dies lässt sich jedoch nicht durch die statistischen Unsicherheiten der Auswertungen erklären. Vielmehr gehen die Abweichungen auf systematische Fehler im Filterdesign zurück, da es äußerst schwer ist, die unterschiedlichen Filterarchitekturen auf das gleiche Verhalten zu trimmen, um einen fairen Vergleich anzustellen. So ist es kaum möglich, Filter- und Referenzsignale bei gleicher Geschwindigkeit und gleichem SNR-Gewinn auf die gleiche Ausgangsamplitude zu normieren oder gar balancierte Filterkoeffizienten zu erhalten. Abweichungen von der Theorie sind aus dem gleichen Grund auch auf Phasen Anpassung der Filter zurückzuführen, die nicht in die theoretischen Berechnungen eingehen. Trotz allem lässt sich feststellen, dass die experimentellen Ergebnisse die Tendenz der theoretischen Vorhersage bestätigen: Das Balancierte Filter liefert den höchsten Gewinn, dicht gefolgt vom NKO Filter (−0,99 dB). In Abhängigkeit der Geschwindigkeitsverteilung (eng/breit), des erforderlichen SNR-Gewinns, der zu erwartenden Partikeldichte und des Ressourcenaufwands, muss für die zukünftige Verwendung zwischen beiden Filtern abgewogen werden. Theoretisch als auch experimentell konnte gezeigt werden, dass das Flankenfilter aufgrund seines schlechten SNR-Gewinns (−4,09 dB im Vergleich zum Balancierten Filter) für die zukünftige Verwendung ausgeschlossen werden kann.

6.2 Nachweis von MCF-7 Zellen

Ein wichtiger Meilenstein für das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz ist der Nachweis biologischer Proben anhand derer die Funktion des Prinzips für den späteren Verwendungszweck gezeigt wird. In diesem Abschnitt wird ein Experiment beschrieben, bei dem angefärbte Brustkrebszellen (MCF-7) zum ersten Mal im vormals beschriebenen Einzel-Detektor-Setup (Kap. 5.1) detektiert werden. Bei MCF-7 (*engl. für Michigan Cancer Foundation*) Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die bereits seit den 70er Jahren kultiviert und zu Forschungszwecken eingesetzt wird.

Für die Verwendung der Zellen in dem hier beschriebenen Versuch, müssen die Zellen zunächst mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Dazu existieren in der Biologie verschiedene Verfahren, von denen hier zwei kurz beschrieben werden. Die einfachste Methode Zellen anzufärben, besteht darin, einer Zellsuspension einen Farbstoff hinzuzufügen, der durch die Zellmembran der Zellen diffundiert und die DNA anfärbt. Eine zweite, spezifischere Methode nutzt einen mit Fluoreszenzmarkern gekoppelten Antikörper, z.B. anti-EpCam (*engl. für epithelial cell adhesion molecule*), der an das epitheliale Zelladhäsionsmolekül auf der Oberfläche von Krebszellen bindet. Während die erste Methode die DNA vieler verschiedenen Zellen anfärbt, kann bei der zweiten Methode, mit Hilfe verschiedener biologischer Aufbereitungsschritte, eine spezifische Anfärbung von Krebszellen in einer Zellsuspension mehrerer Zelltypen erfolgen.

Bei dem hier beschriebenen Experiment besteht die Zellsuspension nur aus entsprechenden Krebszellen, da die Funktion des Messprinzips mit biologischen Proben prinzipiell demonstriert werden soll. Dementsprechend werden die Zellen unspezifisch mit dem Farbstoff CFSE von Invitrogen versetzt, der in die Zellen eindringt und dort zu Esterasen umgebaut wird. Somit können Proteine in und auf der Zelle angefärbt werden. Der verwendete Farbstoff ist so gewählt, dass er sich im Bereich von 445 nm anregen lässt und sein Emissionspektrum mit den verwendeten optischen Filtern des Aufbaus kompatibel ist. Obwohl das Anregungsmaximum des Farbstoffs bei 491 nm liegt und bei 445 nm nur noch mit einer Quanteneffizienz von etwa 20 % zu rechnen ist, kann eine ausreichende Fluoreszenzintensität zur Detektion erreicht werden. CFSE wurde hauptsächlich wegen seiner guten Verfügbarkeit gewählt und könnte leicht durch Farbstoffe wie SYTO45 von Invitrogen ersetzt werden, dessen Anregungsmaximum bei 445 nm liegt.

Als mikrofluidischer Chip kommt durch die Größe der Zellen (ca. 10-30 μm) ein diamantgefräster Kanal zum Einsatz, der eine mittlere Tiefe von etwa 55 μm besitzt. Durch den Fertigungsprozess variiert diese Tiefe um ca. $\pm 4 \mu\text{m}$. Dies wirkt sich jedoch höchstens auf die fluidischen Eigenschaften im Kanal, nicht jedoch auf die Nachweisempfindlichkeit des Messprinzips aus. Durch den verhältnismäßig großen Querschnitt des Kanals wird die Flussrate für die Probe in diesem Versuch auf 2 $\frac{\mu\text{l}}{\text{s}}$ festgelegt, der Hüllstrom auf jeweils 3 $\frac{\mu\text{l}}{\text{s}}$ eingestellt. Bei voller Laserleistung ergibt die Messung ein Streudiagramm gemäß Abb. 6.7, in dem die Zellpopulation eindeutig zu erkennen ist. Für die gewählten Flussraten variiert die Geschwindigkeit der Zellen im Experiment in einem Bereich von 300-450 $\frac{\text{mm}}{\text{s}}$. Verglichen mit den Partikel-Messungen, geht diese äußerst breite Verteilung auf die breite Größenverteilung der Zellen aufgrund verschiedener Wachstumsstadien zurück. Da verschieden große Zellen weiterhin andere Farbstoffmengen tragen, macht sich diese Größenverteilung auch im Intensitätsspektrum der gemessenen Fluoreszenzintensitäten bemerkbar. Weiterhin ist eine Population von Ereignissen im Bereich von 250-300 $\frac{\text{mm}}{\text{s}}$ zu erkennen, bei der es sich um Signal-Nebenkeulen aufgrund der gewählten Sequenz-Filterkombination handelt (Barker-13-Sequenz, Lfd. Nr. 19, siehe Anh. A in Manchester M1-Transformation und Balanciertes Filter). Trotz interpolierter Filter lassen sich in Abb. 6.7 bevorzugte Kanäle erkennen, die stärker besetzt sind, als Nachbarkanäle. Daher sollte für zukünftige Messungen in diesem Geschwindigkeitsbereich die Abtastrate erhöht werden (hier: 100kps), sodass sich mehr Stützstellen auf den Flanken der Filter ergeben und somit geringere Skalierungsfehler auftreten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz in der Lage ist, biologische Proben, sprich Krebszellen, mit ausreichend hohem Signal-zu-Rausch-Abstand

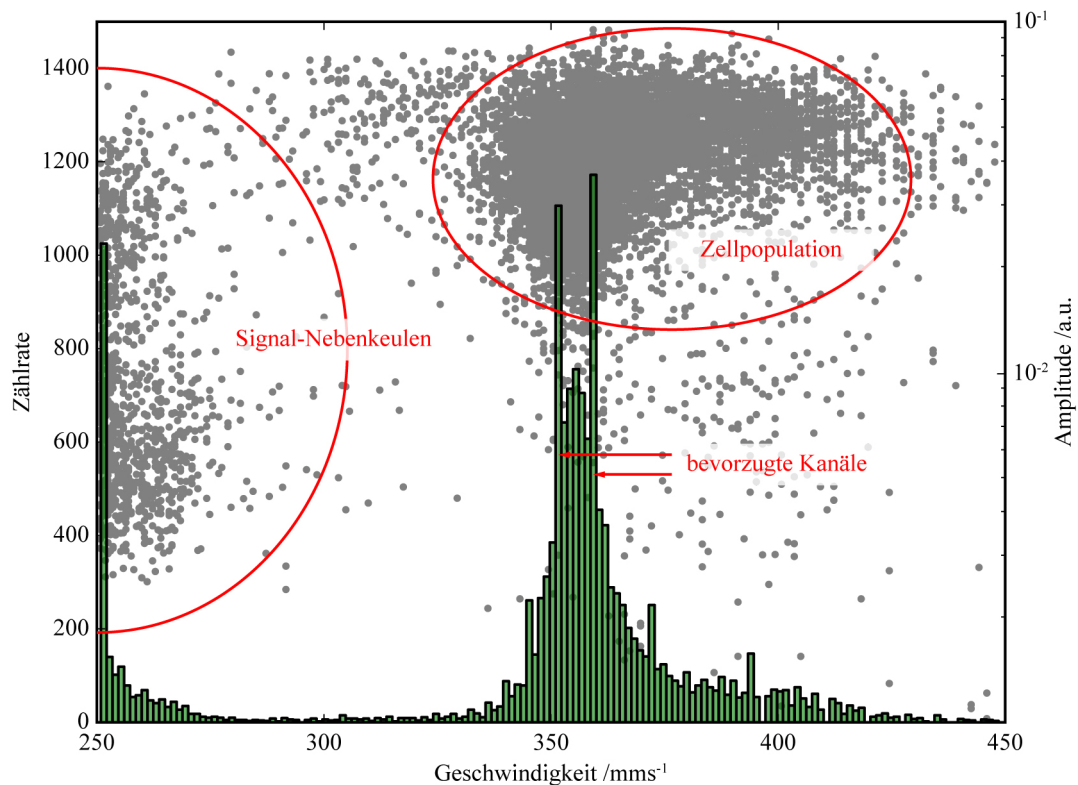


Abb. 6.7: Gezeigt ist das Streudiagramm von unspezifisch angefärbten MCF-7 Zellen beim Nachweis im Einzel-Detektor-Setup. Aufgenommen bei voller Laserleistung ist die Population der Zellen in einem Geschwindigkeitsbereich von 300-450 $\frac{\text{mm}}{\text{s}}$ mit ausreichendem SNR deutlich zu erkennen. Außerdem sind Signal-Nebenkeulen zu erkennen, die aufgrund der verwendeten Modulationssequenz (Barker-13-Sequenz, Lfd. Nr. 19, siehe Anh. A in Manchester M1-Transformation) und dem entsprechenden Balancierten Filter in einem gewissen Abstand auftreten. Im Gegensatz zu Messungen mit Partikeln, weisen die Zellen ein äußerst breites Geschwindigkeitsspektrum auf, was vor allem an der weitaus breiteren Größenverteilung der Zellen liegt. Da kleinere Zellen weniger Farbstoff tragen als größere, sind auch die gemessenen Intensitäten breit verteilt. Durch die

nachzuweisen. Somit ist der Beweis erbracht, dass das Prinzip für entsprechende diagnostische Anwendungen eingesetzt werden kann. Ähnliche Resultate konnten auch für die Markierung mit spezifischen Antikörpern erzielt werden, was in dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt wird. An dieser Stelle sei auf die folgende Dissertation von Lisa Schott verwiesen, der ich herzlich für ihre Hilfe, insbesondere bei der Vorbereitung der biologischen Proben, danke.

6.3 Implementierung von bipolaren Modulationssequenzen durch multiple Detektionspfade

Das Ziel des folgenden Versuchs besteht darin, eine bipolare, zeitliche Modulation des Fluoreszenzlichts erstmals als Messmethode für die Durchflusszytometrie zu demonstrieren. Dazu wird der in Kap. 5.2 beschriebene Aufbau verwendet. Als Messobjekte dienen fluoreszierende Partikel mit einer Größe von $45,0\mu\text{m}$ (Polysciences Fluoresbrite YG Microspheres $45,0\mu\text{m}$). Diese werden durch einen mikrofluidischen Kanal mit einem Kanalquerschnitt von $250\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ geschickt. Der Kanalquerschnitt ist dabei wesentlich größer gewählt als beim Einzel-Detektor-Setup, um ein Verstopfen des Kanals durch die größeren Partikel zu vermeiden.

Durch das hohe Aspektverhältnis des Kanals ist es jedoch nicht möglich, den Chip in einem Heißprägeverfahren mit Silizium-Stempel herzustellen. Daher werden die verwendeten Chips geätzt, was zu insgesamt schlechterer Oberflächenqualität führt. Als Folge tritt bei der Verwendung des Chips starkes Streulicht auf, das trotz entsprechender Filter lokal zu einer Sättigung der Kamera führen kann. Die aufgezeichneten Rohsignale der einzelnen Pixel sind für einen kleinen Ausschnitt des Detektors (Pixel 400 bis 900) für eine Messung von $45,0\mu\text{m}$ großen Partikel in Abb. 6.8 dargestellt. In dieser Abbildung sind Partikel mit verschiedener Fluoreszenzintensität, als auch unterschiedlicher Geschwindigkeit zu erkennen (Steigung der Trajektorie).

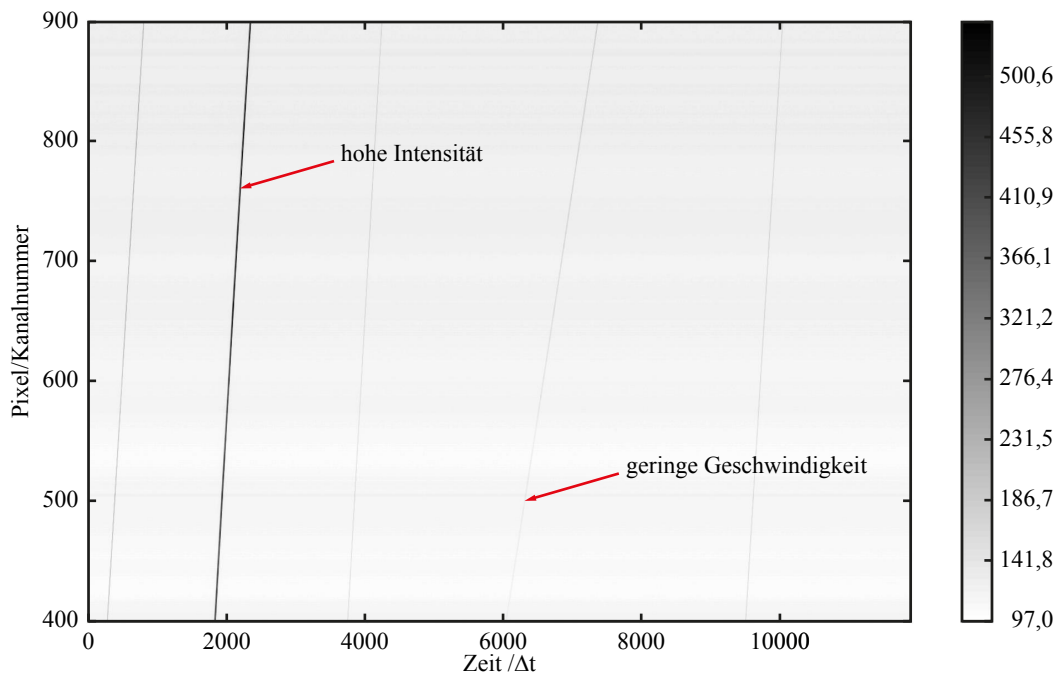


Abb. 6.8: Kamera-Rohsignale verschiedener Partikel der Größe $45,0\mu\text{m}$ in einem Ausschnitt von 500 Pixel (Pixel 400 bis 900). Links ist ein Partikel mit vergleichsweise hoher Intensität zu erkennen, rechts ein Partikel mit vergleichsweise geringer Geschwindigkeit (geringe Steigung der Trajektorie). Intensität aufgetragen in willkürlichen Einheiten (a.u.).

Durch die großen Kanaldimensionen und die Frässpuren ist das fluidische Verhalten über die gesamte Länge der Detektionszone von etwa 50 mm nicht konstant. Beispielsweise ist zu beobachten, dass Partikel lokal beschleunigt und abgebremst werden. Außerdem ist es trotz entsprechend gewählter Optomechanik nur schwer möglich, die Laserlinie exakt auf den Kanal auszurichten und gleichzeitig das Streulicht über die gesamte Länge zu minimieren. Aus diesem Grund wird für die Generierung der Daten nur ein Bereich in der Mitte des Detektors herausgegriffen. Dieser Bereich umfasst insgesamt 3406 Pixel und ist in seiner Position so gewählt, dass möglichst wenig Streulicht die Messung stört. Aufgrund der Länge der Detektionszone kann eine binäre Modulationssequenz der Länge $N = 26$ implementiert werden, wobei

ein Symbol der Sequenz 171 Pixel entspricht. Als Sequenz kommt die in Gl. 149 genannte Sequenz zur Anwendung, die hier in bipolarer Ausführungsweise implementiert wird.

Für die Messung wird der Laser bei einer Leistung von 300 mW betrieben. Diese Einstellung liefert für die verwendeten Partikel zusammen mit der äußerst geringen Flussrate des Probenstroms von $1,6 \frac{\mu\text{l}}{\text{s}}$ bereits genügend Fluoreszenzintensität und optimiert das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Bei dieser Flussrate bewegen sich die Partikel mit einer mittleren Geschwindigkeit von $12,8 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ durch den Kanal. Verglichen mit dem vorangegangenen Experiment in (Kap.6.1) ist diese Geschwindigkeit um mehr als eine Größenordnung geringer gewählt, um Verzerrungen der Signale aufgrund des TDI-Prinzips des Detektors zu verhindern.

Während des Messablaufs werden die Werte sämtlicher Pixel zu jedem Zeitpunkt abgespeichert und die eigentliche Implementierung der Modulationssequenz erfolgt nachgelagert per Software (vgl. Abb. 2.10 (b)). Bevor dies geschieht wird jedoch ein Offset-Abgleich aller Pixel vorgenommen, da sowohl Streulichtanteile, als auch die verschiedenen Verstärkungsprofile einzelner Spalten zu einem unterschiedlich hohen Untergrund des Messsignals führen. Nach diesem Offsetabgleich wird die eigentliche Modulationssequenz auf den Datensatz angewandt und es ergeben sich Resultate wie in Abb. 6.9 (a) gezeigt.

Es lässt sich erkennen, dass sich die bipolaren Modulationssignale offsetfrei um einen Wert von Null bewegen. Neben dem Offsetabgleich ist dies insbesondere der Tatsache geschuldet, dass die verwendete Modulationssequenz balanciert ist und ein konstanter Signaloffset ohnehin unterdrückt wird.

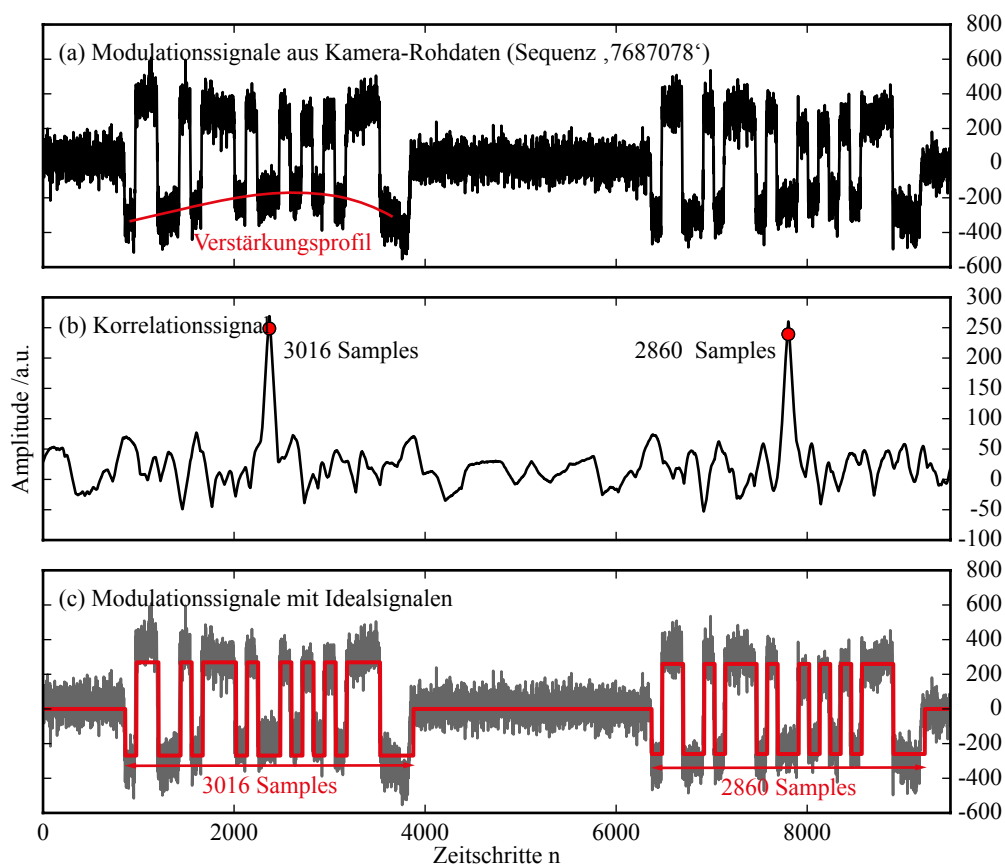


Abb. 6.9: Bipolare Modulationssignale (Sequenz: 7687078), die aus den Kamera-Rohdaten nach Offset-Abgleich gewonnen werden (a). Durch Verarbeitung dieser Signale auf einer entsprechenden Filterbank können Signalpeaks generiert werden, die sowohl die Amplituden- als auch Geschwindigkeitsinformation der Partikel liefern (b). Zur Verifizierung dieser Parameter werden schließlich ideale Signale erzeugt und über die Modulationssequenz aus (a) gelegt (c).

Anhand der Deformation der Signale lässt sich außerdem das Verstärkungsprofil der Kamera erkennen, das einen stark gekrümmten Verlauf zeigt.

Die Auswertung der Signale erfolgt mit einer Filterbank, die auf einen Längenbereich der Signale von 2678 Samples bis 3094 abgestimmt ist. Bei einer Längendifferenz der Filter von jeweils 26 Filterkoeffizienten zum benachbarten Filter resultieren daraus insgesamt 17 Kanäle. Zur Identifizierung gültiger Signalpeaks wird, wie im vorherigen Kapitel erklärt, zu jedem Zeitschritt der maximale Amplitudenwert auf der Geschwindigkeitsachse (Kanäle) gesucht und zusammen mit der Kanal-/Geschwindigkeitsinformation gespeichert. Daraus erhält man das in Abb. 6.9 (b) gezeigte Signal, in dem beide Ereignisse aus (a) vor eindeutig als Peaks zu erkennen sind. Die gefundenen Längen entsprechen dabei 3016 und 2860 Samples. Bei einer effektiven Abtastrate von 4 kHz und einer Messtrecke von ca. $3406 \times 13 \mu\text{m} = 44,28 \text{ mm}$ (100 % Füllfaktor) ergeben sich dabei Geschwindigkeiten von $58,72 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ und $61,93 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$. Diese weichen in erheblichen Maß von der mittleren Geschwindigkeit ab, was ein Indiz für die ungleichmäßigen Flussbedingungen im Kanal sind. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse sind die aus den Auswerteparametern gewonnenen idealen Signale in Abb. 6.9 (c) über die Modulationssignale gelegt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die aus dem Kamera-Setup gewonnenen Signale den theoretischen Erwartungen aus Kap. 2.4 entsprechen. Diese Erkenntnis erlaubt es beispielsweise, zukünftig anwendungsspezifische Detektoren zu konstruieren, bei denen die Modulationssequenz bereits in Hardware umgesetzt ist. Aufgrund der verwendeten Kamera (TDI-Prinzip), den damit verbundenen geringen Flussraten und der geringen Fluoreszenzausbeute, kann das hier verwendete Setup leider nicht oder nur schwer für weiterführende Versuche genutzt werden. Durch die großen Partikel (hohe Fluoreszenzintensität) und dem damit verbundenen großen Kanalquerschnitt ist es außerdem nicht möglich, Flussbedingungen herzustellen, die mit denen in vorherigem Abschnitt vergleichbar wären. Insbesondere die mechanische Bearbeitung der Chips führt zu einer relativ starken Höhenvariation der Kanalhöhe, was zu unvorhersehbaren fluidischen Eigenschaften führt.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz, das 2009 [13] als Alternative zur konventionellen Durchflusszytometrie vorgeschlagen wurde, wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal signaltheoretisch erfasst und beschrieben. Neben der Ausarbeitung verschiedener physikalischer Realisierungsansätze, die sich hauptsächlich in der Zahl ihrer Detektionskanäle unterscheiden, fand auch eine eingehende Diskussion dieser Realisierungen statt.

Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit lag jedoch in der Entwicklung und Optimierung von digitalen Pulskompressionsfiltern, mit deren Hilfe die Messparameter (Intensität und Geschwindigkeit) von fluoreszierenden Zellen zugänglich gemacht werden können. Dabei wurden die Filter so ausgelegt, dass die Falscherkennungsrate aufgrund von Signalnebenkeulen gering gehalten werden kann. Mit dem Balancierten Filter und dem NKO Filter wurden zwei Filterarchitekturen geschaffen, die sowohl eine bessere Signaldynamik als das in [13] verwendete Flankenfilter zeigen, als auch einen wesentlich besseren SNR-Gewinn aufweisen. Beispielsweise erreicht das Balancierte Filter einen theoretischen SNR-Gewinn, der um 3,13 dB über dem Flankenfilter liegt. Experimentell konnte dieser Wert mit 4,09 dB sogar übertroffen werden, was vor allem der Abweichungen realer Signale von theoretisch konstruierten Referenzsignalen zur Generierung der Filter geschuldet ist.

Da die Eigenschaften der Signale nicht nur vom eingesetzten elektronischen Filter, sondern auch von der binären Modulationsfolge der Fluoreszenzsignale abhängen, wurde außerdem ein Modell zur Bewertung solcher Modulationssequenzen entworfen. Dieses Modell orientiert sich für schmale Geschwindigkeitsverteilungen an bekannten Prinzipien der RADAR-Technik und wurde im Rahmen dieser Arbeit für breite Geschwindigkeitsverteilungen erweitert. Dazu wurden neue Bewertungskriterien für binäre Modulationssequenzen geschaffen, die die Korrelationseigenschaften über ein breites Geschwindigkeitsspektrum hinweg beschreiben. Mit Hilfe dieses Modells war es dann möglich, Modulationssequenzen zu finden, die für die Anwendung bessere Eigenschaften besitzen, als bekannte Sequenzen aus der RADAR-Technik.

Für den experimentellen Teil dieser Arbeit wurden insgesamt zwei Aufbauten realisiert. Zum Einen wurde ein Einzel-Detektor-Setup gebaut, um das Prinzip der direkt modulierten Anregung in Verbindung mit verschiedenen Pulskompressionsfiltern zu testen. Mit dem Kamera-Setup konnte erstmals der Vorteil multipler Detektionskanäle als neuartiges Messprinzip der Durchflusszytometrie demonstriert werden. Dazu wurden Fluoreszenzsignale gemäß einer bipolaren Binärsequenz moduliert und mit einer entsprechenden Filterbank ausgewertet. Wie in der Arbeit eingehend beschrieben wurde, besitzen multiple Detektionskanäle den Vorteil, dass die Anforderungen an die nachgelagerte Signalverarbeitungskette drastisch reduziert werden können und die gewonnenen Signale eindeutiger Ergebnisse liefern (unipolare vs. bipolare Signale). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass sich Hardware-Ressourcen bei einem entsprechenden Detektionskonzept einsparen lassen, sodass für spezielle Anwendungsfälle kostengünstige Geräte entwickelt werden können. Dies betrifft beispielsweise den Nachweis von Legionellen, der CD4-Count oder den Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen. Ein Prototyp zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen wird zur Zeit am Fraunhofer ICT-IMM entwickelt und macht sich eine Vielzahl von Erkenntnissen und Ergebnissen dieser Arbeit zu Nutze. Bereits in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich spezifisch angefärbte Brustkrebszellen (MCF-7) identifizieren lassen. Vor allem die digitalen Pulskompressionsfilter, die für die Verwendung mit einem Echtzeit-System zur Signalverarbeitung (z.B. FPGA) optimiert sind, werden zur Zeit im Rahmen einer anschließenden Arbeit für das elektronische Hardware-Design genutzt.

Zukünftig könnte das hier beschriebene Detektionsprinzip auch zur Charakterisierung von Nano-Partikeln genutzt werden, die einen immer stärkeren Einzug in Alltagsprodukte halten. Mit Hilfe kleinerer Kanalstrukturen kann z.B. ein System zur Größenbestimmung von solchen Partikeln realisiert werden. Die 'online'-Größenvermessung bei der Herstellung solcher Partikel ist vor allem für die Entwicklung spezieller Medikamente für die Krebstherapie von Nutzen [52].

Durch die Erweiterung auf mehrere Kanäle zur Fluoreszenz- und Streulichtdetektion, ließe sich das Prinzip außerdem dahingehend erweitern, dass es dem Funktionsumfang eines Standard-Durchflusszytometers nahe kommt. Somit könnten Standard-Laborprotokolle an das Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz angepasst werden mit dem Vorteil eines besseren Signal-zu-Rausch-Gewinns. Verschiedene Kanäle könnten - wie beim konventionellen Durchflusszytometer - über mehrere Strahteiler realisiert oder aber durch entsprechende Oberflächenbeschichtungen eines pixelierten Detektors umgesetzt werden. Vor allem durch die hohe Zahl von Freiheitsgraden, die ein pixelierter Detektor bietet, lohnt es sich an diese Technik anzuknüpfen und spezielle Nachweismethoden auf dieser Basis zu entwickeln. Durch das erhebliche Miniaturisierungspotenzial aller optischen und elektronischen Komponenten ist es ferner denkbar, Handgeräte zur günstigen und flexiblen Point-of-Care-Diagnostik für verschiedene Aufgabenstellungen zu entwickeln.

A LABS-Katalog

Nr.	Länge <i>N</i>	Merit-Faktor	Sequenz
1	2 [46]	2,0000	2
2	3 [46, 53]	4,5000	6
3	4 [53]	4,0000	D
4	4 [46]	4,0000	B
5	5 [46, 53]	6,2500	1D
6	6 [32]	2,5714	34
7	6 [53]	2,5714	28
8	7 [53]	8,1667	58
9	7 [46]	8,1667	72
10	8 [32, 53]	4,0000	97
11	9 [32]	3,3750	0D7
12	9 [53]	3,3750	1E5
13	10 [32]	3,8462	167
14	10 [53]	3,8462	32F
15	11 [53]	12,1000	5B8
16	11 [46]	12,1000	712
17	12 [32]	4,0000	977
18	12 [53]	7,2000	9AF
19	13 [46, 53]	14,0833	1F35
20	14 [32]	5,1579	1483
21	14 [53]	5,1579	335F
22	15 [32]	4,8913	182B
23	15 [53]	7,5000	7CCA
24	16 [32]	4,5714	6877
25	16 [53]	5,3333	CFA9
26	17 [32]	4,5156	0774B
27	17 [53]	4,5156	18329
28	18 [32]	6,4800	190F5
29	18 [53]	6,4800	3C299
30	19 [32]	4,8784	5BB8F
31	19 [53]	6,2241	7A864
32	20 [32]	5,2632	5181B
33	20 [53]	7,6923	FA2C6
34	21 [32]	6,4853	16BB83
35	21 [53]	8,4808	180CA9
36	22 [32]	6,2051	0E6D5F
37	22 [53]	6,2051	3ECAC7
38	23 [32]	5,6277	38FD49
39	23 [53]	5,6277	6DA81C
40	24 [32]	8,0000	64AFE3
41	24 [53]	8,0000	CE0549
42	25 [32]	7,1023	12540E7
43	25 [53]	8,6806	1C7F526
44	26 [32]	7,5111	2380AD9
45	26 [53]	7,5111	36D5F8C
46	27 [32]	9,8514	25BBB87
47	27 [53]	9,8514	70EEED2

Nr.	Länge N	Merit-Faktor	Sequenz
48	28 [32]	7,8400	8F1112D
49	28 [53]	7,8400	E1DDDA4
50	29 [32]	6,7823	164A80E7
51	29 [53]	6,7823	1B4888F1
52	30 [32]	7,6271	2315240F
53	30 [53]	7,6271	3E092A31
54	31 [32]	7,1716	2A498C0F
55	31 [53]	7,1716	7F1CD95A
56	32 [32]	7,1111	01E5AACC
57	32 [53]	8,0000	FEB51CD9
58	33 [32]	8,5078	0CCAA587F
59	33 [53]	8,5078	1FC34AA66
60	34 [32]	8,8923	333FE1A55
61	34 [53]	8,8923	3FC34AA66
62	35 [32]	7,5617	00796AB33
63	35 [53]	8,3904	7F64D4AE3
64	36 [32]	6,8936	3314A083E
65	36 [53]	7,9024	E073AEDAD
66	37 [32]	6,9847	0574276F9E
67	37 [53]	7,9593	1FE1E5AA66
68	38 [32]	8,2989	003C34AA66
69	38 [53]	8,2989	3FC3CB5599
70	39 [32]	6,3908	13350BEF3C
71	39 [53]	7,6818	7F92D8F1AA
72	40 [32]	7,4074	2223DC3A5A
73	40 [53]	7,4074	F0F6916EEE
74	41 [32]	7,5045	038EA520364
75	41 [53]	7,7824	1C3AA66012D
76	42 [32]	8,7327	04447B874B4
77	42 [53]	8,7327	3BBB8478B4B
78	43 [32]	6,7482	005B2ACCE1C
79	43 [53]	8,4817	5CF1ABF92C8
80	44 [32]	6,2857	0FECECB2AD7
81	44 [53]	7,9344	F9F11759AD6
82	45 [32]	6,5747	02AF0CC6DBF6
83	45 [53]	8,5805	1FE4B6270E55
84	46 [32]	6,4908	03C0CF7B6556
85	46 [53]	8,0763	3FCE1D896CAA
86	47 [32]	7,1258	069A7E851988
87	47 [53]	8,1815	7FCE1D896CAA
88	48 [32]	6,1277	156B61E64FF3
89	48 [53]	8,2286	EA80721C9969
90	49 [32]	3,5309	012ABEC79E46F
91	50 [32]	3,8941	025863ABC266F
92	51 [32]	7,5173	0E3F88C89524B
93	52 [32]	4,1472	0945AE0F3246F
94	53 [32]	5,0522	0132AA7F8D2C6F
95	54 [32]	4,5705	0266A2814B3C6F

Nr.	Länge N	Merit-Faktor	Sequenz
96	55 [32]	4,3588	04C26AA1E3246F
97	56 [32]	4,3556	099BAACB47BC6F
98	57 [32]	4,4629	01268A8ED623C6F
99	58 [32]	4,4147	023CE545C9ED66F
100	59 [32]	4,8754	049D38128A1DC6F
101	60 [32]	4,2254	0AB8DF0C973252F
102	61 [54]	3,3827	000B689898F3D46A
103	61 [32]	4,4088	005B44C4C79EA350
104	62 [54]	3,7320	000B5998D32C1D14
105	62 [32]	4,1874	002D66634CB07450
106	63 [55]	9,5870	64CBED0FAFEAC631
107	63 [54]	3,6818	0267AD1238B2BE37
108	63 [32]	4,6475	04CF5A2471657C6F
109	64 [54]	9,8462	26C9FD5F5A1D798C
110	64 [54]	4,8302	55FF84B069386665
111	64 [54]	3,6571	3AD79EA600DC4D36
112	64 [54]	4,0635	1114A9EF893CBE1B
113	64 [54]	4,1290	72D535DFA23602C3
114	64 [54]	4,1967	27DA3FAB8118B634
115	64 [54]	4,2667	40C5DB94DCA6BE43
116	64 [54]	4,2667	41BB058C58DEBE9A
117	64 [54]	4,2667	1153D2B841ECD33F
118	64 [54]	4,2667	7F9E251748696227
119	64 [54]	4,2667	53ADACA8F7CC8381
120	64 [54]	4,2667	154A7A0273E3EDB2
121	64 [54]	4,3390	59C6D86A03B706AF
122	64 [54]	4,3390	02FAF55B4C723670
123	64 [54]	4,3390	602E22FE70D9AE56
124	64 [54]	4,3390	12407CD1ED58AEE7
125	64 [54]	4,3390	149AA72EE7A7C01E
126	64 [54]	4,4138	03C22F5E29AF6653
127	64 [54]	4,4138	79293813AA30CDF7
128	64 [54]	4,4138	55FDC98634962F05
129	64 [54]	4,4138	040EEAE35AC6D92F
130	64 [54]	4,4138	3A2FFC4C964A51C6
131	64 [54]	4,4138	463296AA03C7EC9F
132	64 [54]	4,4138	458F9358135A98EF
133	64 [54]	4,4912	036650F63950EB6F
134	64 [54]	4,4912	33690BAA1461FCFC
135	64 [54]	4,4912	0E83ED52DFD30C4C
136	64 [54]	4,4912	01BA886C9F9E795A
137	64 [54]	4,5714	4023F0DD38E9ADAB
138	64 [54]	4,5714	104AE998E9C2F4BF
139	64 [54]	4,5714	645492B5FB078E63
140	64 [54]	4,5714	7367E1945FA294A1
141	64 [54]	4,5714	1312FDF507962B86
142	64 [54]	4,5714	746F8AE6012BD34B
143	64 [54]	4,6545	56D47A3873024DF6

Nr.	Länge N	Merit-Faktor	Sequenz
144	64 [54]	4,6545	726520F0AFB50CEB
145	64 [54]	4,6545	7BEE28B448B42763
146	64 [54]	4,6545	1B0765B56BBB810E
147	64 [54]	4,6545	514C368D1B3BF90B
148	64 [54]	4,6545	0FFE338322D51696
149	64 [54]	4,6545	5A2F4BBAC71D9809
150	64 [54]	4,6545	055225B93B0F6F3C
151	64 [54]	4,6545	0C5463EEE16C9BD2
152	64 [54]	4,6545	0571986D89BD7AF0
153	64 [54]	4,6545	43FBCEAE3943A4991
154	64 [54]	4,7407	7A022B51DE34D979
155	64 [54]	4,7407	7E6ED5261A29EC21
156	64 [54]	4,7407	2D3D5081DCC7D9B2
157	64 [54]	4,7407	4DB007AAF1E96333
158	64 [54]	4,7407	576DD2310D2BE307
159	64 [54]	4,7407	6450537AE317E876
160	64 [54]	4,7407	388F4AA025F367E6
161	64 [54]	4,7407	5ECEE91A4516F1C1
162	64 [54]	4,7407	1E8D4CC935047BEB
163	64 [54]	4,8302	00B5ACD5D661E4CF
164	64 [54]	4,8302	1496AAC489F0CFE7
165	64 [54]	4,8302	6AD664C03E30DAEB
166	64 [54]	4,8302	520A47B1BB28F3E5
167	64 [54]	4,8302	6EA2DCDED0270E13
168	64 [54]	4,8302	55FF84B069386665
169	64 [54]	4,8302	40C5CB965586F27B
170	64 [54]	4,8302	40A5A7544CF70FB3
171	64 [54]	4,9231	333C367FA1942ACA
172	64 [54]	4,9231	100F559B23F3969E
173	64 [54]	4,9231	4F69E1D9C4A902EE
174	64 [54]	4,9231	72A0623AF0D6DB27
175	64 [54]	4,9231	1BC80695E3D7564E
176	64 [54]	4,9231	57074924EC433AF7
177	64 [54]	4,9231	10CD2D6447C5CABF
178	64 [54]	4,9231	7BC0E7AAE44C134B
179	64 [54]	4,9231	2101F3D2EE2ED1AE
180	64 [54]	4,9231	260D09BCDEA1DF54
181	64 [54]	4,9231	512826BDE83E71B3
182	64 [54]	4,9231	56AFAEC909BC0CE1
183	64 [54]	5,0196	6F827CF09052ACEE
184	64 [54]	5,0196	6060F6DE22F519D6
185	64 [54]	5,0196	3C63F7E1724948AA
186	64 [54]	5,0196	4057986B459B1F9B
187	64 [54]	5,0196	081DE9C4F29DD176
188	64 [54]	5,0196	54D07A253B0873EF
189	64 [54]	5,0196	03B068F3A8A35B7B
190	64 [54]	5,0196	10D6E82B876BB363
191	64 [54]	5,1200	2E892BD1098DF71E

Nr.	Länge N	Merit-Faktor	Sequenz
192	64 [54]	5,1200	1891C9B6A6A1DFE2
193	64 [54]	5,1200	0186F24DD8EAC6AF
194	64 [54]	5,1200	49BDF6253B07382A
195	64 [54]	5,1200	245835717B0B3DE6
196	64 [54]	5,1200	60F133C8529A2BF7
197	64 [54]	5,1200	49A63152971707FE
198	64 [54]	5,1200	044AF5974C6F2C2F
199	64 [54]	5,1200	20C33D5C5A7F44EC
200	64 [54]	5,1200	057918E1C8B97DB6
201	64 [54]	5,1200	42817F333CB2AE2D
202	64 [54]	5,1200	454233FE25CB4F0D
203	64 [54]	5,1200	150AC1E72DA26FEC
204	64 [54]	5,2245	203433F638DDA6AB
205	64 [54]	5,2245	3AB5C6484A3EC87E
206	64 [54]	5,2245	6EA26D2970C41B9F
207	64 [54]	5,2245	72AB8D62D26240FF
208	64 [54]	5,2245	79B2CE4F4AC6A807
209	64 [54]	5,2245	44157A9873697E1B
210	64 [54]	5,2245	007F15C6A6D3A72E
211	64 [54]	5,2245	5AB777413078C279
212	64 [54]	5,2245	3B9DD3A740578692
213	64 [54]	5,2245	30F184F2154BFBB2
214	64 [54]	5,3333	2A816C4BD98C3CFE
215	64 [54]	5,3333	2220DDD6C1F4E35E
216	64 [54]	5,3333	50BD0E28CCD24BFB
217	64 [54]	5,3333	003E2E2D6AE734DB
218	64 [54]	5,3333	5AD1024D758EEE0F
219	64 [54]	5,3333	082DACE2E57CC9F2
220	64 [54]	5,4468	34923C077778D1AB
221	64 [54]	5,4468	4940D93F543AF339
222	64 [54]	5,4468	0287CECCB6A3DC53
223	64 [54]	5,4468	64F8B015C67D62D6
224	64 [54]	5,4468	39C00B5978BCBB66
225	64 [54]	5,4468	02A8F34E969E466F
226	64 [54]	5,4468	0C75F6D2A5F02CCC
227	64 [54]	5,5652	4C279A0789397BAB
228	64 [54]	5,5652	5050CE7A542FE4DB
229	64 [54]	5,5652	06F98E9BB9E8D052
230	64 [54]	5,5652	0849CF72ACBE48FC
231	64 [54]	5,5652	3334A47A0175DF3C
232	64 [54]	5,6889	754ED896D808C7E3
233	64 [54]	5,6889	24213BD55F30F27C
234	64 [54]	5,6889	33CD9C7A3EA6B402
235	64 [54]	5,6889	155AD600F30D9F9B
236	64 [54]	5,6889	00DCCDB2D6BA870F
237	64 [54]	5,6889	08F5834B6FCBA8CC
238	64 [54]	5,6889	13FE6B48F0E25532
239	64 [54]	5,8182	763250EA83A469FE

Nr.	Länge N	Merit-Faktor	Sequenz
240	64 [54]	5,8182	15EA86B0B0336DF3
241	64 [54]	5,8182	364C661E12D0ABFE
242	64 [54]	5,8182	1118EED9A1FA1A7A
243	64 [54]	5,8182	55006DB92F33D38D
244	64 [54]	5,8182	1558E072D219B37F
245	64 [54]	5,9535	4C6B0578128FAF9B
246	64 [54]	5,9535	47C156AC890DBCE7
247	64 [54]	6,2439	0E7066A149F6FA9A
248	64 [54]	6,2439	70AA8F009F6B5B33
249	64 [54]	6,2439	0FF28A258B967672
250	64 [54]	6,4000	204EDB4B9DC1EA8E
251	64 [54]	6,5641	514D38913EFC37A1
252	64 [32]	5,2784	4090A2E9E63237C2
253	65 [54]	3,4073	0005B8161B379CA8A
254	65 [32]	4,6327	002DC0B0D9BCE5450
255	66 [54]	4,6047	001A6D151CE7C4AD0
256	66 [32]	5,6571	0069B454739F12B42
257	67 [54]	4,1488	003F8E8B263152921
258	67 [32]	5,0438	20506C9AB1E909CC2
259	68 [55]	9,2480	FFD0B564E4D74798E
260	68 [32, 54]	4,6802	009E49E3662A8EA50
261	69 [54]	3,4905	00463811FB4B41B26A
262	69 [32]	6,2976	026FDB09A83A118E15
263	70 [54]	4,5120	0684CED38C24FB755F
264	71 [56]	6,0155	63383AB6B452ED93FE
265	72 [56]	6,0000	E4CD5AF0D054433D82
266	73 [56]	5,5052	1B66B26359C3E2BC00A
267	74 [56]	6,8967	36DDBED681F98C70EAE
268	75 [56]	7,8782	6399C983D03EFDB556D
269	76 [56]	6,8436	DB69891118E2C2A1FA0
270	77 [56]	5,5102	1961AE251DC950FDDBF4
271	78 [56]	7,5484	328B457F0461E4ED7B73
272	79 [55]	9,2050	7F36491D815A531AA871
273	79 [56]	7,1082	76CF68F327438AC6FA80
274	80 [55]	9,0909	FFE81E89A8D1C665A9A5
275	80 [56]	6,2500	CE43C8D986ED429F7D75
276	81 [56]	6,3576	0E3C32FA1FEFD2519AB32
277	82 [56]	6,5536	3CB25D380CE3B7765695F
278	83 [56]	6,5113	711763AE7DBB8482D3A5A
279	84 [56]	6,0619	CE79CCCDDB6003C1E95AAA
280	85 [56]	5,8079	19900199463E51E8B4B574
281	86 [56]	6,5220	3603FB659181A2A52A38C7
282	87 [56]	6,6278	7F7184F04F4E5E4D9B56AA
283	88 [56]	6,3268	D54A9326C2C686F86F3880
284	89 [55]	9,1678	1FF924F246C19C2D4B8D454
285	89 [56]	6,0008	180E09434E1BBC44ACDAC8A
286	90 [56]	5,7123	3326D87C3A91DA8AFA84211
287	91 [56]	5,3843	77F80E632661C3459492A55

Nr.	Länge N	Merit-Faktor	Sequenz
288	92 [56]	6,4709	CC6181859D9244A5EAA87F0
289	93 [56]	5,6162	187B2ECB802FB4F56BCCECE5
290	94 [56]	6,8709	319D9676CAFEADD68825F878
291	95 [55]	9,3427	7FFC0FA333154B534DA71C69
292	95 [56]	4,7054	69566B2ACCC8BC3CE0DE0005
293	96 [56]	5,0749	CF963FD09B1381657A8A098E
294	97 [56]	5,2272	1A843DC410898B2D3AE8FC362
295	98 [55]	9,0775	3FFAA55B45978719636C4F633
296	98 [56]	6,5871	30E05C18A1525596DCCE600DF
297	99 [56]	6,1180	72E6DB6A75E6A9E81F0846777
298	100 [57]	3,0012	B257F1822E35AC95FC7F74729
299	100 [57]	2,6233	1C056C81C6AC87015B3F8E54D
300	100 [57]	2,6681	1C056C9C056C87015B38FEA4D
301	100 [57]	2,6233	B2A71FB257F1ECA9C7F36A038
302	100 [57]	2,9727	B2A71F98FD5B6CA9C7F9C0A92
303	100 [57]	2,4390	B257F1CE5A2FEC95FC6C69740
304	100 [57]	2,9446	1C056C9E7F2547015B386036A
305	100 [57]	2,7871	1C056CFE8B4E47015B205D2C6
306	100 [57]	2,4777	A93F9E0E02B66A4FE79C7F526
307	100 [57]	2,8902	C301B524A81CF0C06D56D5F8C
308	100 [57]	2,8637	9CB45FCA7177E72D17ED63A20
309	100 [57]	2,7382	9B501C4A7177E6D4070D63A20
310	100 [57]	2,9446	CE05494A7177F381524D63A20
311	100 [57]	3,1526	FBA394CE5A2FFEE8E52C69740
312	100 [57]	2,9446	FBA394CDA80E3EE8E52C95FC7
313	100 [57]	2,6015	A93F9E6702A4AA4FE7863F56D
314	100 [57]	2,8637	FC72A6CDA80E3F1CA9AC95FC7
315	100 [57]	2,7871	9CB45FE3FA93672D17E7015B2
316	100 [57]	2,7144	FD169CFDD1CA7F45A7208B8D6
317	100 [57]	2,7871	FD169CE702A4BF45A7263F56D
318	100 [57]	2,8902	C7F526FE8B4E71FD49A05D2C6
319	100 [57]	2,8902	9B501C7DD1CA66D407008B8D6
320	100 [57]	2,8637	9B501C7E395366D4070071AB2
321	100 [57]	2,7144	9B501C63FA9366D40707015B2
322	100 [57]	2,6911	CE05496180DAB38152479FC95
323	100 [57]	2,9446	CE05497E8B4E738152405D2C6
324	100 [57]	2,9727	49503981C6AC92540E7F8E54D
325	100 [57]	3,1526	4950399C056C92540E78FEA4D
326	100 [57]	2,6681	B257F1B257F1EC95FC736A038
327	100 [57]	3,1526	B257F198FD5B6C95FC79C0A92
328	100 [57]	3,1526	B257F1A4A81CEC95FC76D5F8C
329	100 [57]	2,9446	1C056CAB6030C7015B3527F3C
330	100 [57]	3,1211	1C056CCE5A2FC7015B2C69740
331	100 [57]	3,0600	A93F9E24A81CEA4FE796D5F8C
332	100 [57]	2,5381	FC72A68E02B67F1CA9BC7F526
333	100 [57]	2,8902	9CB45FD92BF8E72D17E9B501C
334	100 [57]	2,5381	9B501C59538FE6D40709AB1C0
335	100 [57]	3,0902	CE054959538FF3815249AB1C0

Nr.	Länge N	Merit-Faktor	Sequenz
336	100 [57]	2,8637	FBA394FE8B4E7EE8E5205D2C6
337	100 [57]	3,0012	FBA394E702A4BEE8E5263F56D
338	100 [57]	2,9446	C301B54DA80E30C06D4C95FC7
339	100 [57]	2,6681	FC72A6E702A4BF1CA9A63F56D
340	100 [57]	2,7871	9CB45FCDA80E272D17EC95FC7
341	100 [57]	2,4390	FD169CE3FA937F45A727015B2
342	100 [57]	3,2510	C7F526FDD1CA71FD49A08B8D6
343	100 [57]	2,7144	C7F526CDA80E31FD49AC95FC7
344	100 [57]	2,7382	9B501C549FCF26D4070AD80C3
345	100 [57]	2,9446	9B501C4E5A2FE6D4070C69740
346	100 [57]	3,0012	CE05497DD1CA738152408B8D6
347	100 [57]	2,8637	CE05497E39537381524071AB2
348	100 [57]	3,1526	CE054963FA9373815247015B2
349	100 [57]	3,1211	495039822E3592540E7F74729
350	100 [57]	3,0012	94E2EF9C056CA538BBF8FEA4D
351	100 [57]	3,3201	94E2EFB257F1E538BBF36A038
352	100 [57]	3,1211	94E2EF98FD5B6538BBF9C0A92
353	100 [57]	2,3127	4DA80E1C056C936A0398FEA4D
354	100 [57]	2,9446	1C056CCA7177C7015B2D63A20
355	100 [57]	2,8637	1C056CD9538FC7015B29AB1C0
356	100 [57]	3,0012	495039CA7177D2540E6D63A20
357	100 [57]	2,7871	C301B50E02B670C06D5C7F526
358	100 [57]	3,0902	FC72A6A4A81CFF1CA9B6D5F8C
359	100 [57]	3,3921	9CB45F8E02B6672D17FC7F526
360	100 [57]	2,8637	9B501C592BF8E6D40709B501C
361	100 [57]	2,7624	CE0549592BF8F3815249B501C
362	100 [57]	3,0012	FBA394E3FA937EE8E527015B2
363	100 [57]	2,9446	A93F9E4DA80E2A4FE78C95FC7
364	100 [57]	2,8902	C301B56702A4B0C06D463F56D
365	100 [57]	2,8637	9CB45FFDD1CA672D17E08B8D6
366	100 [57]	2,7871	9CB45FE702A4A72D17E63F56D
367	100 [57]	3,1211	FD169CCDA80E3F45A72C95FC7
368	100 [57]	2,4777	C7F526CE5A2FF1FD49AC69740
369	100 [57]	3,2175	C7F526E702A4B1FD49A63F56D
370	100 [57]	3,1211	9B501C6180DAA6D407079FC95
371	100 [57]	3,3921	9B501C7E8B4E66D407005D2C6
372	100 [57]	2,8377	CE0549549FCF3381524AD80C3
373	100 [57]	3,1211	CE05494E5A2FF381524C69740
374	100 [57]	2,4201	C7F526E3FA9371FD49A7015B2
375	100 [56]	5,7208	DF490FFB1F8390A54E3CD9AAE
376	101 [56]	5,3689	1A5048216CCF18F83E910DD4C5
377	102 [55]	9,1746	383F0C38A4D5D6673480256A44
378	102 [56]	5,6605	2945A4F11CE44FF664850D182A
379	103 [56]	3,1897	77FAAB2C6E065AC4BE18F274CB
380	104 [56]	6,0357	E568ED4982F9660EBA2F611184
381	105 [56]	5,8894	1C6387FF5DA4FA325C895958DC5
382	126 [55]	9,0720	3C7854315FE710B9990BB655FB2FE96D
383	149 [55]	9,1137	1FE0003921C9CC3E4CBD0CE52CD8DA392AAA55

Nr.	Länge N	Merit-Faktor	Sequenz
384	149 [55]	9,0542	1C71C7AB46CDDABF9F82959501DCC6F016DB6D
385	157 [55]	9,0223	1F0600F83071FF993CC57ECD39955B6B294AA6B5
386	165 [55]	9,2351	1D5B2B41689B1B24BAA6E846010E31B1887AF031FD
387	169 [55]	9,3215	1C1C7C623B8EB1FD05DAFDD41DEBD5B0491226D6DAD
388	172 [55]	9,0526	E03F9CF6030FF9EDBF293338351C5954B2A74D952A5
389	173 [55]	9,3645	1E03F9CF6030FF9EDBF293338351C5954B2A74D952A5
390	173 [55]	9,3179	18006FFE1FCF33F079C3D999D2D96B5334D5A5546AA9
391	175 [55]	9,0768	6AA32AF1A35998A5E530DAF8D30687D9983792FF37FE
392	177 [55]	9,5052	1D3842C58FCB33401779175F7B977AAF330D49EC2E93D
393	178 [55]	9,2915	3D3842C58FCB33401779175F7B977AAF330D49EC2E93D
394	179 [55]	9,0974	7A70858B1F9666802EF22EBEF72EF55E661A93D85D27A
395	183 [55]	9,0073	6311C73B838E2A72BF958A85FD81ABF27F6DB5BB249136
396	189 [55]	9,0847	1C39CE1FE1CBC67F3B7BF9002AB951713566D0DA55A4D92D

B LabView Code zur Filteroptimierung

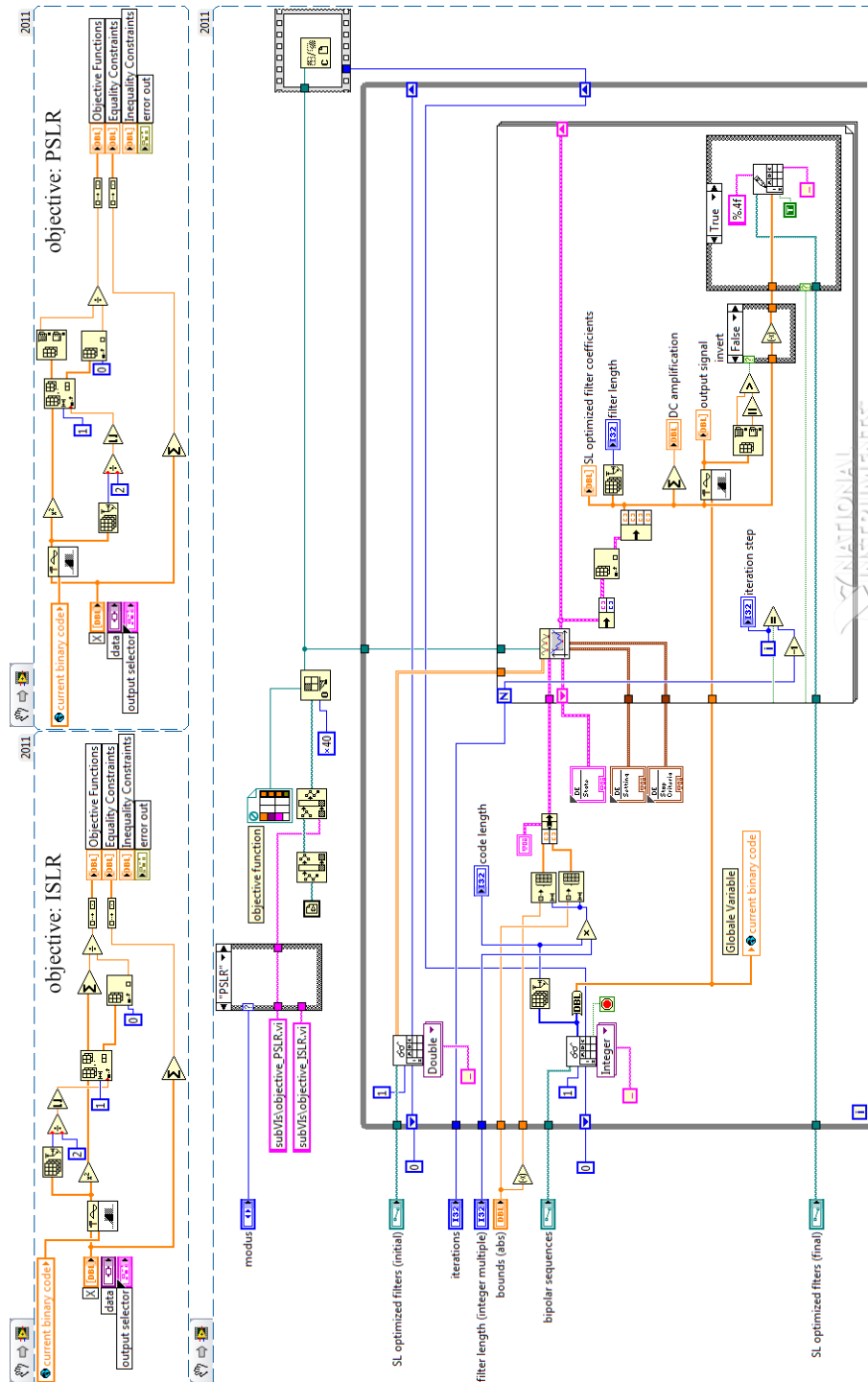


Abb. B.1: Optimierungsroutine für das NKO Filter. Eine Optimierung kann hinsichtlich des ISLRs und des PSLRs erfolgen.

C LabView Code zur Erzeugung von Komplementären Codes

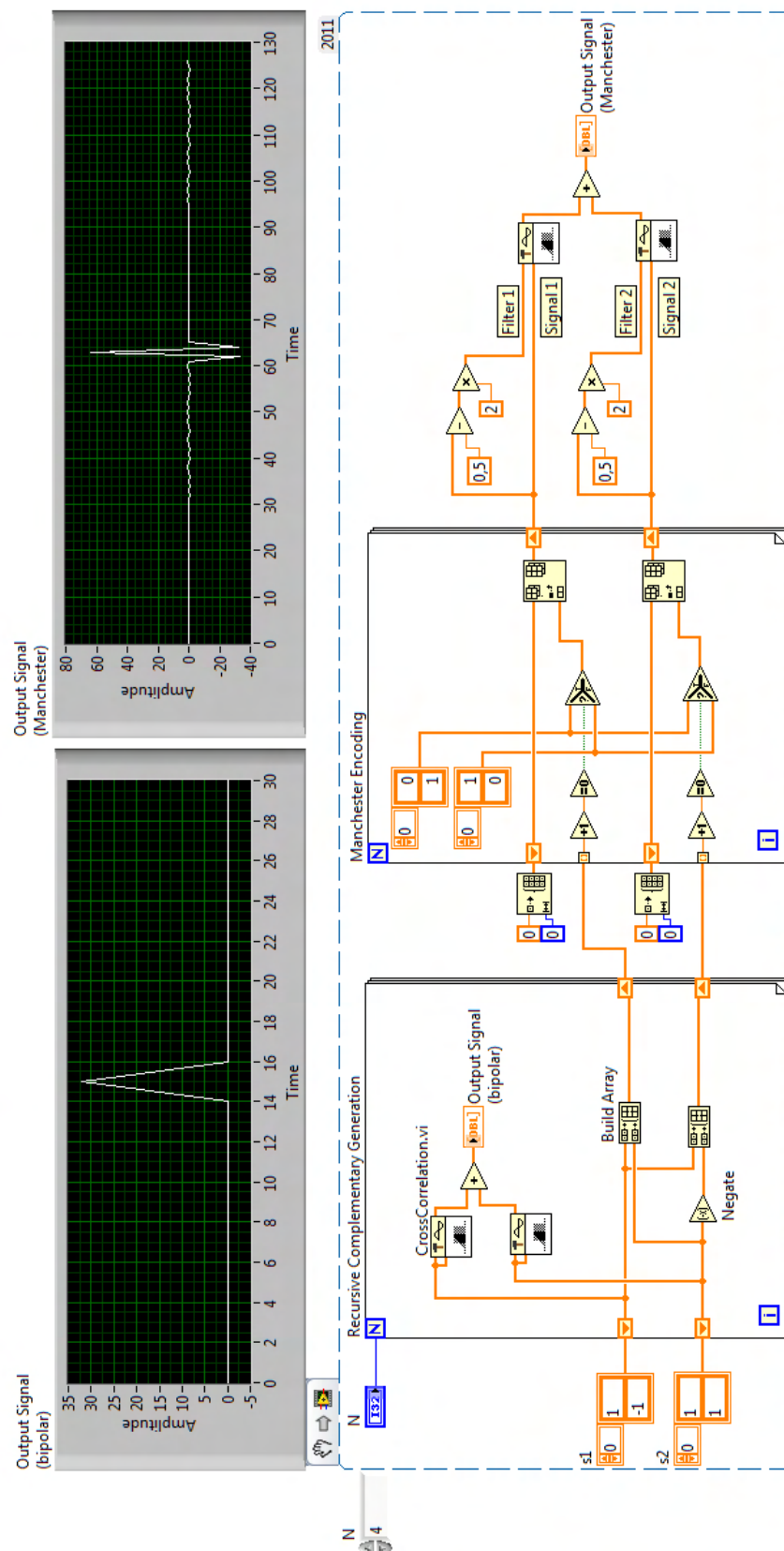


Abb. C.1: Rekursive Generierung von Komplementären Codes in bipolarer und Manchester-Notation.

Literatur

- [1] W. H. Coulter, *Means for counting particles suspended in a fluid*, 1953, US Patent 2656508.
- [2] A. Moldavan, *Photo-electric technique for the counting of microscopical cells*, Science **80**, 188 (1934).
- [3] M. D. Graham, *The Coulter principle: Foundation of an industry*, Journal of Laboratory Automation **8**, 72 (2003).
- [4] W. Dittrich and W. Göhde, *Automatisches Mess- und Zaehlgeraet fuer die Teilchen einer Dispersion*, 1971, DE Patent 1815352 A1.
- [5] <http://www.abdserotec.com/>.
- [6] H. M. Shapiro, *Practical Flow Cytometry*, John Wiley & Sons, 2003.
- [7] P. Paterlini-Brechot and N. L. Benali, *Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions*, Cancer Letters **253**, 180 (2007).
- [8] D. Yi, A. M. Skelly, K. D. Merdek, K. M. Sprott, C. Jiang, W. E. Pierceall, J. Lin, M. Stocum, W. P. Carney, and D. A. Smirnov, *Microfluidics and circulating tumor cells*, The Journal of Molecular Diagnostics **15**, 149 (2013).
- [9] N. Bednarz-Knoll, C. Alix-Panabières, and K. Pantel, *Clinical relevance and biology of circulating tumor cells*, Breast Cancer Research **13** (2011).
- [10] S. Mocellin, U. Keilholz, C. R. Rossi, and D. Nitti, *Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers*, TRENDS in Molecular Medicine **12**, 130 (2006).
- [11] G.-B. Lee, C.-C. Chang, S.-B. Huang, and R.-J. Yang, *The hydrodynamic focusing effect inside rectangular microchannels*, Journal of micromechanics and microengineering **16**, 1024 (2006).
- [12] M. Baßler, P. Kiesel, O. Schmidt, and N. M. Johnson, *Means for counting particles suspended in a fluid*, 2008, US Patent 0080181827 A1.
- [13] P. Kiesel, M. Baßler, M. Beck, and N. M. Johnson, *Spatially modulated fluorescence emission from moving particles*, Applied Physics Letters **94**, 4 (2009).
- [14] P. Kiesel, M. Beck, and N. M. Johnson, *Monitoring CD4 in whole blood with an opto-fluidic detector based on spatially modulated fluorescence emission*, Cytometry Part A **79A**, 317 (2011).
- [15] R. W. Hamming, *Digital Filters, Third Edition*, Dover Publications, Inc., Mineola, New York, 1998.
- [16] R. Schafer and A. Oppenheim, *Discrete-Time Signal Processing, Third Edition*, Pearson Education, Limited, 2010.
- [17] G. Segré and A. Silberberg, *Radial particle displacements in Poiseuille flow of suspensions*, Nature **189**, 209 (1961).
- [18] G. Segré and A. Silberberg, *Behaviour of macroscopic rigid spheres in Poiseuille flow part 2. experimental results and interpretation.*, Journal of Fluid Mechanics **14**, 136 (1962).
- [19] S. Hur, N. Henderson-MacLennan, E. McCabe, and D. Di Carlo, *Deformability-based cell classification and enrichment using inertial microfluidics*, Lab on a Chip **11**, 912 (2011).
- [20] D. Di Carlo, *Inertial microfluidics*, Lab Chip **9**, 3038 (2009).

-
- [21] C. Sommer, S. Quint, P. Spang, T. Walther, and M. Baßler, *The equilibrium velocity of spherical particles in rectangular microfluidic channels for size measurement*, Lab Chip **14**, 2319 (2014).
- [22] C. Sommer, S. Quint, P. Spang, T. Walther, and M. Baßler, *Studying the Segré-Silberberg effect by velocimetry in microfluidic channels*, Advances in Fluid Mechanics X **82**, 256 (2014).
- [23] C. Sommer, *Die Größenabhängigkeit der Gleichgewichtsgeschwindigkeit von Partikeln beim Transport in Mikrokanälen*, PhD thesis, Technische Universität Darmstadt, 2014.
- [24] J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, and R. Deutzmann, *Duale Reihe: Biochemie, 3. Aufl.*, Thieme, Stuttgart, 2012.
- [25] S. Quint and M. Baßler, *Verfahren zur Detektion von strahlungsemitierenden Partikeln*, 2014, DE Patent 102013105953.8.
- [26] C. Sommer, M. Baßler, S. Quint, and P. Spang, *Verfahren und Vorrichtung zum Nachweisen von ungelösten Teilchen in einem Fluid*, 2014, DE Patent 102013210952.0.
- [27] C. Sommer, M. Baßler, S. Quint, and P. Spang, *Verfahren und Vorrichtung zum Nachweisen von ungelösten Teilchen in einem Fluid*, 2014, DE Patent 102013210953.9.
- [28] A. Ludloff, *Praxiswissen Radar und Radarsignalverarbeitung, 4. Auflage*, Vieweg + Teubner, 2008.
- [29] T. Frey and M. Bossert, *Signal- und Systemtheorie, 2. Auflage*, Vieweg + Teubner, 2008.
- [30] K. H. Ruhm, *Nichtstationäre Signale*, Internet-Portal ‘Wissenschaft und Technik des Messens’; Dokument: www.mmm.ethz.ch/dok01/d00000374.pdf (2008).
- [31] N. Levanon, *Cross-correlation of long binary signals with longer mismatched filters*, IEE Proc.-Radar Sonar Navig. (2005).
- [32] N. Levanon and E. Mozeson, *Radar Signals*, Wiley, New York, 2004.
- [33] N. Levanon, *Noncoherent pulse compression*, IEEE Transactions on Aerospace and Electronic Systems **42**, 756 (2006).
- [34] U. Peer and N. Levanon, *Compression waveforms for non-coherent radar*, 2007 IEEE Radar Conference , 104 (2007).
- [35] D. Kravitz, D. Grodensky, N. Levanon, and A. Zadok, *High-resolution low-sidelobe laser ranging based on incoherent pulse compression*, IEEE Photonics Technology Letters **24**, 2119 (2012).
- [36] M. J. E. Golay, *Multi-slit spectrometry*, J. Opt. Soc. Am. **39**, 437 (1949).
- [37] M. J. E. Golay, *Complementary series*, IRE Transactions on Information Theory **7**, 82 (1961).
- [38] J. Jedwab and M. G. Parker, *Golay complementary array pairs*, Designs, Codes and Cryptography **44**, 209 (2007).
- [39] N. Levanon, *Noncoherent radar pulse compression based on complementary sequences*, IEEE Transactions on Aerospace and Electronic Systems **45**, 742 (2009).
- [40] A. W. Rihaczek and R. M. Golden, *Range sidelobe suppression for Barker codes*, IEEE Transactions on Aerospace and Electronic Systems **AES-7**, 1087 (1971).
- [41] M. H. Ackroyd and F. Ghani, *Optimum mismatched filters for sidelobe suppression*, IEEE Transactions on Aerospace and Electronic Systems **AES-9**, 214 (1973).

-
- [42] S. Zoraster, *Minimum peak range sidelobe filters for binary phase-coded waveforms*, IEEE Transactions on Aerospace and Electronic Systems **AES-16**, 112 (1980).
- [43] M. H. Ackroyd, *Economical filters for range sidelobe reduction with combined codes*, Radio and Electronic Engineer **52**, 309 (1982).
- [44] H. Rohling and W. Plagge, *Mismatched-filter design for periodical binary phased signals*, IEEE Transactions on Aerospace and Electronic Systems **25**, 890 (1989).
- [45] X. H. Chen and J. Oksman, *A new algorithm to optimize Barker code sidelobe suppression filters*, IEEE Transactions on Aerospace and Electronic Systems **26**, 673 (1990).
- [46] R. Turyn and S. Storer, *On binary sequences*, Proceedings of the American Mathematical Society **12**, 394 (1961).
- [47] R. Storn and K. Price, *Differential evolution - a simple and efficient adaptive scheme for global optimization over continuous spaces*, 1995.
- [48] M. J. E. Golay, *Sieves for low autocorrelation binary sequences*, IEEE Transactions on Information Theory **IT-23**, 43 (1977).
- [49] M. J. E. Golay, *The Merit factor of long low autocorrelation binary sequences*, IEEE Transactions on Information Theory **IT-28**, 543 (1982).
- [50] B. Militzer, M. Zamparelli, and D. Beule, *Evolutionary search for low autocorrelated binary sequences*, IEEE Transactions on Evolutionary Computation **2**, 34 (1998).
- [51] J. E. Gallardo, C. Cotta, and A. J. Fernández, *Finding low autocorrelation binary sequences with memetic algorithms*, Journal of Applied Soft Computing **9**, 1252 (2009).
- [52] M. E. Davis, Z. Chen, and D. M. Shin, *Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer*, Nature Reviews Drug Discovery **7**, 771 (2008).
- [53] S. Mertens, *Exhaustive search for low-autocorrelation binary sequences*, Journal of Physics A: Mathematical and General **29**, L473 (1996).
- [54] G. E. Coxson and J. C. Russo, *Efficient exhaustive search for optimal-peak-sidelobe binary codes*, IEEE Transactions on Aerospace and Electronic Systems **41**, 302 (2005).
- [55] P. Borewein, R. Ferguson, and J. Knauer, *The merit factor problem*, 2000.
- [56] C. J. Nunn and G. E. Coxson, *Best-known autocorrelation peak sidelobe levels for binary codes of length 71 to 105*, IEEE Transactions on Aerospace and Electronic Systems **44**, 392 (2008).
- [57] S. K. Shanmugam, C. Mongrédien, J. Nielsen, and G. Lachapelle, *Design of short synchronization codes for use in future GNSS system*, International Journal of Navigation and Observation (2008), Article ID 246703.



Wissenschaftlicher Werdegang

1995 - 2004	Illtal-Gymnasium Illingen
Juni 2004	Abitur
August 2004 - April 2005	Zivildienst
April 2005 - Mai 2011	Studium der Physik an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Oktober 2007	Vordiplom
Februar 2009 - August 2009	Forschungsaufenthalt an der University of Illinois at Urbana-Champaign (Prof. P. G. Kwiat)
April 2010	Diplom-Hauptprüfung
Mai 2010 - Mai 2011	Diplomarbeit mit Schwerpunkt Quanteninfor- mationsverarbeitung in Innsbruck (Prof. R. Blatt)
September 2011 bis Dezember 2014	Promotion am Fraunhofer ICT-IMM/ TU Darm- stadt auf dem Gebiet der Durchflusszytometrie (Prof. T. Walther)
	Promotionsprüfung am 17.12.2014



Danksagung

Diese Arbeit hätte ohne die Hilfe und das Mitwirken verschiedener Personen nicht entstehen können. Daher möchte ich mit dem Abschluss meiner Promotion jenen Menschen danken, die mich die letzten Jahre auf meinem Weg begleitet haben.

Mein Dank gilt vor allem Prof. Thomas Walther, der mich als Doktorand in seiner Gruppe aufgenommen und hervorragend aus der Ferne betreut hat.

Für die Betreuung am Fraunhofer ICT-IMM gilt mein besonderer Dank Dr. Michael Baßler, der mich für das Thema der Arbeit begeistert hat und stets offen für neue Ideen und Diskussionen war. Die großen wissenschaftliche wie auch finanzielle Freiräume, die er mir in seiner Arbeitsgruppe geboten hat, haben erheblich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich in besonderer Weise bei Peter Spang, der mich bei der Konstruktion und Fertigung meiner Aufbauten und Chips tatkräftig unterstützt hat. Durch Einbringen seiner Erfahrung und Ideen hat er es mir ermöglicht, meine experimentellen Aufbauten binnen kurzer Zeit zu realisieren. Seine nette Gesellschaft und sein stets offenes Ohr weiß ich nach drei Jahren auch abseits der Arbeit hoch zu schätzen.

My special thanks and appreciation go to Professor Nadav Levanon who was always open for new ideas and technical discussions in the field of RADAR technology. His professional assistance in signal processing as well as his personal support greatly helped me to keep track.

Bei Frau Karen Böhling bedanke ich mich recht herzlich für das Korrekturlesen aller englischen Texte.

Bei meiner Arbeitsgruppe und Kollegen bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Konstruktion und dem Aufbau der Experimente sowie für die Hilfe beim Messen.

Christian Sommer gilt mein Dank für die regen Diskussionen um die optischen Aufbauten und Auswerterroutinen.

Roland Rohloff danke ich für die Unterstützung beim Aufbau der Experimente und der Programmierung der Datenaufnahme während seines Praktikums, seiner Bachelor-Arbeit und seiner Zeit als 'Hiwi' am Institut.

Thomas Rosenkranz danke ich für seine Hilfe bei der Aufnahme der Messreihen an meinem Versuchsaufbau.

Ebenso danke ich Jörn Wittek für die Unterstützung bei den Messungen und die regen technischen Diskussionen.

Ferner danke ich Lisa Schott und Carmen Schwind, die mich bei der Vorbereitung biologischer Proben und Partikelsuspensionen in hohem Maß unterstützt haben.

Meiner Arbeitsgruppe in Darmstadt danke ich für die nette Atmosphäre und Zusammenarbeit. Stets hattet ihr ein offenes Ohr, wenn es Probleme zu lösen galt.

Meinen Freunden und vor allem meinen Eltern danke ich für die kompromisslose Unterstützung während meiner Zeit als Doktorand und meiner gesamten Ausbildung. Durch Eure Hilfe, Ratschläge und Ablenkung von frustrierenden Momenten habt Ihr mich zum Ziel dieses langen Weges geführt!



Erklärung zur Dissertation

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation ohne Hilfe Dritter nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Darmstadt, den 14. Juli 2015

(S. Quint)
